

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗΣ SDF-1 α
(STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 α)**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΕΛΛΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗΣ SDF-1 α
(STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 α)



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΕΛΛΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7373/1
Ημερ. Εισ.: 09-09-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΜΠΕ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

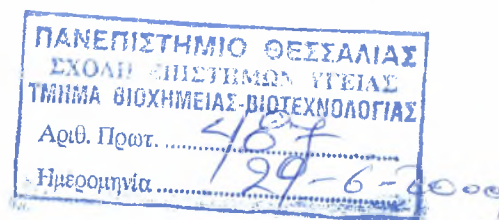


004000087202

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗΣ SDF-1α
(STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1α)**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΕΛΛΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ**



Επιβλέπων Καθηγητής

Παναγιωτίδης Α. Χρήστος
Αναπληρωτής Καθηγητής Κυτταρικής / Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Παναγιωτίδης Α. Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Κυτταρικής / Μοριακής
Βιολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ.

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2008 – 2009. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Χρήστο Α. Παναγιωτίδη, για την επιστημονική κατάρτιση, την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του, που συνέβαλαν καθοριστικά στην άψογη συνεργασία μας. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω θερμά την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Στόικου Μαρία, για την πολύτιμη βοήθειά της και για το ιδανικό κλίμα συνεργασίας που είχαμε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, Δρ. Σταθόπουλο Κωνσταντίνο και Δρ. Κοντού Μαρία, για την ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
A.1. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ.....	8
A.1.1. Εισαγωγή.....	8
A.1.2. Λειτουργικός ρόλος των χημειοκινών.....	9
A.1.3. Δομή και ταξινόμηση των χημειοκινών.....	10
A.2. CXC ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ.....	13
A.2.1. Δομή και χαρακτηριστικά των CXC χημειοκινών.....	13
A.2.2. Υποδοχείς των CXC χημειοκινών (CXCRs).....	15
A.3 ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗ SDF-1.....	19
A.3.1. Δομή της χημειοκίνης SDF-1.....	19
A.3.2. Χαρακτηριστικά του γονιδίου του SDF-1.....	21
A.3.3. SDF-1 και CXC χημειοκίνες.....	22
A.3.4. Ενεργοποίηση του CXCR4 υποδοχέα και μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης από τον SDF-1.....	23
A.3.5. Απευαισθητοποίηση του CXCR4.....	27
A.3.6. Σύνδεση του SDF-1 με γλυκοζαμινογλυκάνες του στρώματος.....	29
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
B.1. ΥΛΙΚΑ.....	30
B.1.1. Χημικά Αντιδραστήρια.....	30
B.1.2. Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας.....	30
B.1.3. Ένζυμα και Αντισώματα.....	31
B.1.4. Εκκινητές Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.....	31
B.1.5. Βιολογικά Υλικά.....	31
B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
B.2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	32

B.2.2. Κλωνοποίηση Τμημάτων DNA σε Βακτηριακούς Φορείς – Αντίδραση λιγάσης.....	35
B.2.3. Παρασκευή παγωμένων επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Top10)	37
B.2.4. Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Top10 ή BL21[DE3]).....	38
B.2.5. Παρασκευή μικροποσοτήτων πλασμιδιακού DNA (mini-preps).....	38
B.2.6. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με χρήση στήλης.....	39
B.2.7. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA.....	41
B.2.8. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	42
B.2.9. Καλλιέργειες των στελεχών E.coli BL21(DE3) και Rosetta (DE3).....	43
B.2.9.1. Έλεγχος της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.....	43
B.2.9.2. Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τα στελέχη E.coli BL21(DE3) και Rosetta (DE3).....	44
B.2.9.3. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης από τα στελέχη E.coli BL21(DE3).....	45
B.2.10. Απομόνωση και καθαρισμός βακτηριακών εκχυλισμάτων.....	45
B.2.11. Χρωματογραφικός καθαρισμός του SDF-1α με στήλη αγκιστείας Ni ²⁺ - NTA αгарόζης.....	47
B.2.12. Προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford.....	50
B.2.13. Ηλεκτροφόρηση.....	50
B.2.13.1. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	50
B.2.13.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	52
B.2.13.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές Tricine.....	55
B.2.14. Χρώση πηκτής ακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue (CBB R- 250).....	57
B.2.15. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης – Ανοσοαποτύπωμα Western (Western Blotting).....	57
2.16. Ανοσοποίηση κουνελιού.....	59
B.2.16.1. Συλλογή προάνοσου ορού.....	59
B.2.16.2. Ανοσοποίηση κουνελιού.....	60
B.2.16.3. Συλλογή αντιορού.....	61

B.2.16.4. Έλεγχος του τίτλου των αντιορών	61
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
Γ.1. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗΣ SDF-1α.....	62
Γ.1.1. Ενίσχυση του cDNA της ανθρώπινης χημειοκίνης SDF-1α.....	62
Γ.1.2. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR στο βακτηριακό φορέα pZero2.1.....	66
Γ.1.3. Κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του ώριμου SDF-1α στον βακτηριακό φορέα έκφρασης pET21b.....	68
Γ.1.4. Αλληλούχιση των ανασυνδυασμένων φορέων έκφρασης.....	70
Γ.1.5. Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α.....	72
Γ.1.6. Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α.....	73
Γ.1.7. Έλεγχος της διαλυτότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α στο κύτταρο της E.coli.....	75
Γ.1.8. Καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α με στήλη χρωματογραφίας συγγενείας σε ακινητοποιημένο μέταλλο (IMAC).....	77
Γ.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SDF-1α - ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ....	82
Γ.2.1. Συλλογή και Έλεγχος του Τίτλου των Αντιορών	82
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	84
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι χημειοκίνες, μικρές χημειοτακτικές κυτταροκίνες, αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές της μετανάστευσης των κυττάρων. Ο προερχόμενος από κύτταρα του στρώματος παράγοντας-1 (Stromal cell-derived factor-1 / SDF-1), είναι μια αγγειογενετική CXC χημειοκίνη, μεγέθους 8 kDa, η οποία εκφράζεται ιδιосυσύστατα από κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών, αλλά και από πολλά άλλα όργανα και ιστούς και αποτελεί έναν ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα T- και B-λεμφοκύτταρα, τα μονοπύρρηνα και τα ουδεταρόφιλα. Η δέσμευσή του επί του υποδοχέα του CXCR4 ενεργοποιεί πολλαπλά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, τα οποία εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ότι ο υποδοχέας του, CXCR4, χρησιμοποιείται από τον ιό της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου-1 (HIV-1) ως συνυποδοχέας για την είσοδο του στα T-λεμφοκύτταρα.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός βακτηριακού συστήματος για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανασυνδυασμένου SDF-1 και συγκεκριμένα της ισομορφής α της χημειοκίνης (SDF-1α). Η ~~παραγωγή~~ του cDNA του SDF-1α που κωδικοποιεί την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης (αα 22-89), δηλαδή χωρίς το σηματοδοτικό πεπτίδιο, ενισχύθηκε με τη μέθοδο της nested PCR και κατόπιν κλωνοποιήθηκε με την μέθοδο TA στον βακτηριακό φορέα pZeTa. Η μετέπειτα κλωνοποίησή των αλληλουχιών του SDF-1α στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET21b, οδήγησε στην ενσωμάτωση μιας «ουράς» 6 ιστιδινών (6His) στο καρβοξυ-τελικό άκρο του SDF-1α. Στελέχη BL21[DE3] της E.coli χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε μεγάλα ποσά. Καθώς διαπιστώθηκε ότι ο SDF-1α δεν αναδιπλωνόταν σωστά και συγκεντρωνόταν στα βακτηριακά έγκλειστα, η πρωτεΐνη καθαρίσθηκε από αυτά υπό μετουσιωτικές συνθήκες με χρήση χρωματογραφίας αγκιστείας σε στήλη Ni-NTA-αγαρόζης. Επιπλέον εξετάσθηκαν και οι συνθήκες αναδίπλωσης του καθαρού SDF-1α. Τέλος μελετήθηκε και η ικανότητα της χημειοκίνης αυτής να προκαλεί τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος ενός κόνικλου και παρασκευάσθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα ενάντια στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Χημειοκίνες

A.1.1. Εισαγωγή

Οι χημειοκίνες είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν μια οικογένεια μικρών κυτταροκινών. Εκκρίνονται τόσο από κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, όσο και από ενδοθηλιακά κύτταρα και ορισμένα επιθηλιακά. Το όνομά τους προέρχεται από την ικανότητά τους να εμφανίζουν χημειοτακτική δράση, γι' αυτό και αναφέρονται ως χημειοτακτικές κυτταροκίνες. Ως κυτταροκίνες χαρακτηρίζονται οι σηματοδοτικοί παράγοντες που εμπλέκονται σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών, όπως αυτών της φλεγμονής, της κυτταρικής διαίρεσης και της διαφοροποίησης, της οργανογένεσης, της αιμοποίησης και της επικοινωνίας των νευρώνων. Οι χημειοκίνες εντοπίζονται σε όλα τα σπονδυλωτά, μερικούς μύς και βακτήρια, αλλά καμία δεν έχει περιγραφεί για άλλα ασπόνδυλα.

Η πρώτη χημειοτακτική κυτταροκίνη ταυτοποιήθηκε το 1977, όταν ο Walz και οι συνεργάτες του αλληλούχησαν τον παράγοντα 4 των αιμοπεταλίων (Platelet Factor 4, PF4), ένα μόριο που αποθηκεύεται στα αιμοπετάλια και εμφανίζει αντιπηκτική και αγγειοστατική δράση. Το χρονικό διάστημα από το 1984 έως και το 1989, κατά τη διάρκεια πειραμάτων γονιδιακής ενεργοποίησης, απομονώθηκε μία σειρά παραγόντων που εμπλέκονταν στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η εύρεση της ιντερλευκίνης (IL)–8, το 1987, αποτέλεσε ορόσημο στην ιστορία της ανοσολογίας, καθώς υπήρξε ο πρώτος ταυτοποιημένος παράγοντας που βρέθηκε να προκαλεί εκλεκτική χημειοταξία σε εξειδικευμένο τύπο λεμφοκυττάρων, τα ουδετερόφιλα.

Οι χημειοκίνες θεωρείται ότι έχουν προέλθει από αρχέγονες πρωτεΐνες με ζωτικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες, μέσω διπλασιασμού και επιλεκτικών μεταλλάξεων των γονιδίων τους κατά τα τελικά στάδια της εξέλιξης. Οι σηματοδοτικές αυτές πρωτεΐνες έχουν αναπτυχθεί εξελικτικά για λόγους οργάνωσης του ανοσοποιητικού συστήματος και προστασίας του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών

και παραγόντων φλεγμονής. Η τελευταία υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι ορισμένοι ιοί όπως ο ιός της Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (HIV-1) και οι ιοί του Απλού Έρπητα (HSV-1, HSV-2) έχουν αναπτύξει μηχανισμούς εκμετάλλευσης του δικτύου των χημειοκινών, με σκοπό την επιβίωση τους στο εσωτερικό του ξενιστή. Επιπρόσθετα, σε διάφορες περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων έχει αναφερθεί δυσλειτουργία των χημειοκινών και των υποδοχέων τους, γεγονός που έρχεται να δώσει έμφαση στη σημασία της κατανόησης του φυσιολογικού ρόλου και της πολυπλοκότητας του δικτύου αυτού ^[1].

A.1.2. Λειτουργικός ρόλος των χημειοκινών

Ο κύριος ρόλος των χημειοκινών είναι να δρουν ως ~~παράγοντες~~ οι οποίοι καθοδηγούν την μετανάστευση των κυττάρων. Τα ~~κύτταρα~~ τα οποία προσελκύονται από χημειοκίνες ακολουθούν σήματα αυξανόμενης συγκέντρωσης των χημειοκινών από την πηγή προέλευσής τους. ~~Άλλες~~ χημειοκίνες χαρακτηρίζονται ως ομοιοστατικοί παράγοντες και εμπλέκονται στον έλεγχο της μετανάστευσης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια διαδικασιών «άνοσης επιτήρησης», όπως παραδείγματος ~~χάριν~~, καθοδηγούν τα λεμφοκύτταρα στους λεμφαδένες προκειμένου αυτά να ελέγξουν για είσοδο παθογόνων. Μια άλλη κατηγορία χημειοκινών παίζει ρόλο ~~στην~~ ανάπτυξη, καθώς προάγει την αγγειογένεση, τη δημιουργία δηλαδή νέων αιμοφόρων αγγείων. Τέλος, κάποιες χημειοκίνες χαρακτηρίζονται ως φλεγμονώδεις παράγοντες και εκκρίνονται από μια ποικιλία κυττάρων ως απάντηση σε μολύνσεις από βακτήρια, ιούς και άλλους παράγοντες οι οποίοι προκαλούν καταστροφές στον οργανισμό. Η απελευθέρωση των χημειοκινών αυτών διεγείρεται συνήθως από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες έχουν κυρίως την ικανότητα να προσελκύουν λευκοκύτταρα και να στρατολογούν μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στα σημεία της λοίμωξης. Ως αποτέλεσμα, ενεργοποιούν τα κύτταρα ώστε αυτά να ξεκινήσουν μια ανοσοαπόκριση. Οι φλεγμονώδεις χημειοκίνες εκκρίνονται από

διάφορους τύπους κυττάρων και «καθοδηγούν» τόσο τα κύτταρα του έμφυτου όσο και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος.

A.1.3. Δομή και ταξινόμηση των χημειοκινών

Η οικογένεια των χημειοκινών αποτελείται, μέχρι σήμερα, από περίπου 50 μέλη. Πρόκειται για μικρές βασικές πρωτεΐνες 70-125 αμινοξέων, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 6 έως 14 kDa. Οι χημειοκίνες συντίθενται ως προ-πεπτίδια, φέροντας στην αρχή του μορίου τους ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, περίπου 20 αμινοξέων, το οποίο αποκόπτεται από την ώριμη πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της έκκρισής τους από το κύτταρο. Οι περισσότερες από αυτές εκκρίνονται, ενώ κάποιες άλλες, παραδείγματος χάριν η φρακταλκίνη, βρίσκονται αγκυροβολημένες στην επιφάνεια των κυττάρων. Όλες έχουν κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά, καθώς όλες περιέχουν συντηρημένα κατάλοιπα αμινοξέων, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δημιουργία της τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής τους. Τα αμινοξέα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία σχηματίζουν ζεύγη. Οι τέσσερις αυτές κυστεΐνες σχηματίζουν δύο δισουλφικούς δεσμούς, έναν μεταξύ πρώτης και τρίτης κυστεΐνης και έναν μεταξύ δεύτερης και τέταρτης. Οι δύο πρώτες κυστεΐνες εντοπίζονται κοντά στο N-τελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης, η τρίτη εντοπίζεται στο κέντρο του μορίου, ενώ η τέταρτη βρίσκεται κοντά στο C-τελικό άκρο. Μία θηλιά περίπου δέκα αμινοξέων ακολουθεί τις δύο πρώτες κυστεΐνες και είναι γνωστή ως N-θηλιά (N-loop). Έπειτα ακολουθεί μια ατελής δεξιόστροφη α-έλικα, η οποία καλείται 3_{10} -έλικα, τρία β-πτυχωτά φύλλα και μια C-τελική α-έλικα.

Τα μέλη της οικογένειας των χημειοκινών κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με την απόσταση ανάμεσα στα δύο πρώτα κατάλοιπα κυστεΐνης:

a) CC χημειοκίνες

Οι CC χημειοκίνες, ή αλλιώς β-χημειοκίνες, έχουν δύο παρακείμενα κατάλοιπα κυστεΐνης (C-C) κοντά στο αμινο-τελικό άκρο τους. Έχουν χαρακτηριστεί

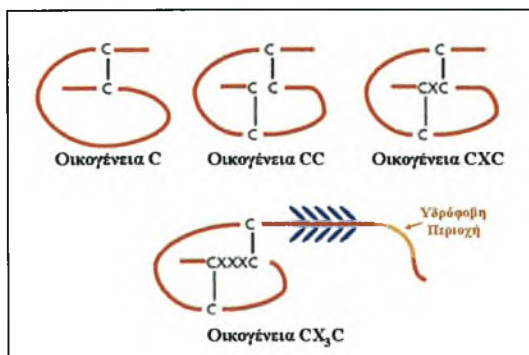
τουλάχιστον 27 μέλη αυτής της υπο-οικογένειας για τα θηλαστικά, τα οποία καλούνται προσδέτες των CC χημειοκινών CCL-1 έως -28. Οι CC χημειοκίνες επάγουν τη μετανάστευση των μονοκυττάρων και άλλων κυττάρων, όπως τα φυσικά-κυτταροκτόνα κύτταρα (NK κύτταρα) και τα δενδριτικά κύτταρα, καθώς δεσμεύονται και ενεργοποιούν τους υποδοχείς των CC χημειοκινών (CCR1-10), οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια διαφορετικών κυτταρικών τύπων.

b) C χημειοκίνες

Οι χημειοκίνες αυτές είναι γνωστές και ως γ-χημειοκίνες και διαφέρουν από τις χημειοκίνες των άλλων ομάδων στο γεγονός ότι περιέχουν μόνο δύο κατάλοιπα κυστεΐνης, εκ των οποίων η μία εντοπίζεται στο αμινο-τελικό άκρο και η δεύτερη παρακάτω. Μόνο δύο χημειοκίνες αυτού του τύπου έχουν περιγραφεί και καλούνται λεμφοτακτίνη-α (XCL1) και λεμφοτακτίνη-β (XCL2). Οι χημειοκίνες αυτές προσελκύουν τα πρόδρομα T κύτταρα στον θύμο αδέν.

c) CX₃C χημειοκίνες

Τα μέλη αυτής της ομάδας χημειοκινών φέρουν τρία τυχαία αμινοξέα (XXX) ανάμεσα στα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης και ονομάζονται CX₃C χημειοκίνες, ή δ-χημειοκίνες. Η μόνη CX₃C χημειοκίνη που έχει ανακαλυφθεί είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη φρακταλκίνη (CX₃CL1).



Εικόνα 1. Τριτοταγής Δομή Χημειοκινών

Οικογένεια	Όνομα	Σύντ/ση	Παλιό Όνομα
CXC	CXCL1	GRD α	Growth-related oncogene α
	CXCL2	GRD β	Growth-related oncogene β
	CXCL3	GRD γ	Growth-related oncogene γ
	CXCL4	PF-4	Platelet factor-4
	CXCL5	ENA-78	Epithelial cell-derived neutrophil-activating factor 78
	CXCL6	GCP-2	Granulocyte chemoattractant protein-2
	CXCL7	NAP-2	Neutrophil-activating protein-2
	CXCL8	IL-8	Interleukin-8
	CXCL9	Mig	Monokine induced by γ -interferon
	CXCL10	IP10	γ -Interferon-inducible protein-10
	CXCL11	ITAC	Interferon- γ -inducible T-cell α -chemoattractant
	CXCL12	SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
	CXCL13	BCA	B-cell-activating chemokine 1
	CXCL14	RRAK	River and kidney chemokine
	CXCL16		
CC	CCL1	I-309	
	CCL2	MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
	CCL3	MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
	CCL4	MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein-1 β
	CCL5	RANTES	Regulated on activation normal T-cell-expressed and secreted
	CCL7	MCP-3	Monocyte chemoattractant protein-3
	CCL8	MCP-2	Monocyte chemoattractant protein-2
	CCL11	Eotaxin	
	CCL13	MCP-4	Monocyte chemoattractant protein-4
	CCL14	HCC-1	Hemofiltrate CC-chemokine-1
	CCL15	HCC-2	Hemofiltrate CC-chemokine-2
	CCL16	HCC-4	Hemofiltrate CC-chemokine-4
	CCL17	TARC	Thymus- and activation-related chemokine
	CCL18	BARC	Pulmonary- and activation-regulated chemokine
	CCL19	ELC	Epstein-Barr virus-induced receptor ligand chemokine
	CCL20	TARC	Liver- and activation-related chemokine
	CCL21	SLC	Secondary lymphoid tissue chemokine
	CCL22	MDC	Macrophage-derived chemokine
	CCL23	MIPF-1	Myeloid progenitor inhibitory factor-1
	CCL24	MIPF-2	Myeloid progenitor inhibitory factor-2
	CCL25	TECK	Thymus-expressed chemokine
	CCL26	Eotaxin-3	
	CCL27	ESKine	Skinkine
	CCL28	MEC	Mucosa-associated epithelial chemokine
C	XCL1		Lymphotactin α
	XCL2		Lymphotactin β
CX3C	CX3CL1		Fractalkine

Πίνακας 1. Χημειοκίνες – Μέλη των Τεσσάρων Οικογενειών.

Διαφοροποιημένη αναπαραγωγή από Rosenkilde & Schwartz, J.APMIS.2004; 112:481-495

Λόγω του γεγονότος ότι η πρωτεΐνη που μελετάται στην εργασία αυτή (SDF-1) ανήκει στην τέταρτη υπο-οικογένεια των χημειοκινών και συγκεκριμένα στις CXC χημειοκίνες, η κατηγορία αυτή θα παρουσιαστεί με περισσότερες λεπτομέρειες:

A.2. CXC χημειοκίνες

A.2.1. Δομή και χαρακτηριστικά των CXC χημειοκινών

Η υπο-οικογένεια των CXC χημειοκινών, ή αλλιώς α-χημειοκίνες, απαρτίζεται μέχρι στιγμής από 17 μέλη στα θηλαστικά. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις χημειοκίνες έχουν προέλθει από ένα κοινό γονίδιο-πρόγονο, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων διπλασιασμού. Αυτό διαπιστώνεται και από το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα γονίδια εμφανίζουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως το ότι αποτελούνται από τρία έως τέσσερα εξόνια, φέρουν ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης περίπου 100 κωδικονίων (με ομοιότητα έως και 80% στο επίπεδο της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης) και τα περισσότερα από αυτά συνεντοπίζονται στο χρωμόσωμα 4 ^[2]. Συγκεκριμένα, στο χρωμόσωμα 4 εντοπίζονται τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις χημειοκίνες CXCL1-11 και CXCL13, ενώ το γονίδιο που κωδικοποιεί την χημειοκίνη SDF-1(CXCL12) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10, τα ~~γονίδια~~ που κωδικοποιούν τις χημειοκίνες CXCL14 και CXCL15 εντοπίζονται στο ~~χρωμόσωμα~~ 5, το γονίδιο που κωδικοποιεί την CXCL16 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και τέλος το γονίδιο της CXCL17 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19.

Στις CXC χημειοκίνες, τα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης του αμινοτελικού άκρου χωρίζονται από ένα και μόνο τυχαίο ~~αμινοξύ~~, το οποίο αντιπροσωπεύεται από τα γράμματα «X». Οι CXC χημειοκίνες ~~μπορούν~~ να χωριστούν περαιτέρω σε δύο υποομάδες, με βάση την παρουσία ή ~~μη~~ μιας συντηρημένης αλληλουχίας τριών αμινοξέων στο N-τελικό άκρο του μορίου τους, η οποία εντοπίζεται πριν τη θέση της πρώτης κυστεΐνης ^[3]. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται ELR και αποτελείται κατά σειρά από τα αμινοξέα: Γλουταμινικό οξύ (E), Λευκίνη (L) και Αργινίνη(R). Οι χημειοκίνες οι οποίες φέρουν την τριπεπτιδική αλληλουχία ELR καλούνται ELR-θετικές χημειοκίνες. Οι ELR(+) χημειοκίνες επάγουν εξειδικευμένα τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων και αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς χημειοκινών (CXC Receptors) CXCR1 και CXCR2. Κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), η οποία δρα αποκλειστικά επί των ουδετερόφιλων, προάγοντας τα να αφήσουν την κυκλοφορία του αίματος και να εισέλθουν στους

παρακείμενους ιστούς. Η δεύτερη ομάδα των CXC χημειοκινών χαρακτηρίζεται από την απουσία του ELR μοτίβου, καλούνται ELR-αρνητικές και είναι εκλεκτικοί χημειοτακτικοί παράγοντες των λεμφοκυττάρων. Στην ομάδα των ELR(-) χημειοκινών ανήκει και ο SDF-1 (CXCL12).

Η παρουσία ή μη του ELR μοτίβου καθορίζει, εκτός από την χημειοτακτική δραστηριότητα των δύο ομάδων CXC χημειοκινών, και την αγγειογενετική ή αγγειοστατική δράση των τελευταίων. Η αγγειογένεση είναι μια βιολογική διαδικασία, κατά την οποία παρατηρείται η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα μικροαγγεία, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις ^[4-9]. Τα μέλη των CXC χημειοκινών τα οποία φέρουν το ELR μοτίβο (ELR-θετικές χημειοκίνες) είναι πιθανοί προαγωγείς της αγγειογένεσης ^[10]. Αντίθετα, οι CXC χημειοκίνες οι οποίες επάγονται από τις γ-ιντερφερόνες και δεν φέρουν το ELR μοτίβο (ELR-αρνητικές), είναι πιθανοί αναστολείς της αγγειογένεσης. Η διατήρηση, επομένως, της ισορροπίας στην έκφραση των ELR(+) και ELR(-) χημειοκινών είναι σημαντική για την ορθή πορεία της αγγειογενετικής διαδικασίας ^[10-11].

Οι αγγειογενετικές χημειοκίνες (ELR+) έχουν ως κυριότερο εκπρόσωπο την IL-8, και επάγουν άμεσα την χημειοτακτική και πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ η αγγειογενετική τους δραστηριότητα είναι ανεξάρτητη από την ικανότητά τους να επάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις ^[10,12-14].

Οι υποδοχείς οι οποίοι εμπλέκονται στην αγγειογενετική δραστηριότητα των ELR(+) χημειοκινών είναι, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι υποδοχείς CXCR1 και CXCR2 ^[2,10,15-19]. Αντίθετα, οι ELR(-) χημειοκίνες χαρακτηρίζονται ως αγγειοστατικές χημειοκίνες, και κυριότερος εκπρόσωπός τους είναι η χημειοκίνη IP-10 (CXCL10) ^[20-24]. Εξαίρεση της οικογένειας των αγγειοστατικών χημειοκινών αποτελεί ο παράγοντας SDF-1, ο οποίος, ενώ δεν φέρει την αλληλουχία ELR στο μόριό του, έχει βρεθεί ότι έχει αγγειογενετική δραστηριότητα ^[25].

Μία τελευταία διάκριση των CXC χημειοκινών βασίζεται στα χαρακτηριστικά της λειτουργίας και της έκφρασής τους ^[1]. Με βάση αυτά τα κριτήρια, οι CXC χημειοκίνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις σταθερές και τις επαγόμενες χημειοκίνες. Στην πρώτη κατηγορία των σταθερών ή ομοιοστατικών χημειοκινών, ανήκουν μόρια τα οποία εκφράζονται διαρκώς στον οργανισμό και είναι υπεύθυνα

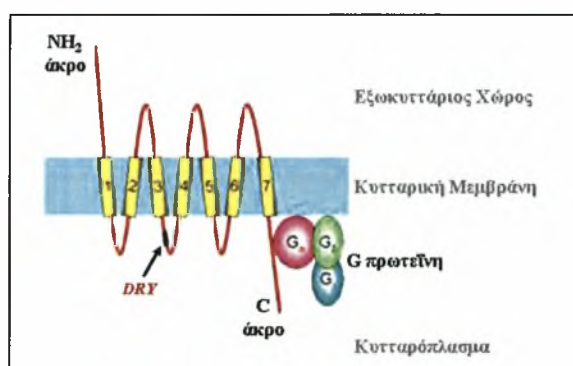
για τη χημειοταξία των λεμφοκυττάρων και των δένδριτικών κυττάρων. Οι ομοιοστατικές CXC χημειοκίνες καθοδηγούν τα λεμφοκύτταρα είτε στον μυελό των οστών και το θύμο αδένα κατά τη διαδικασία της αιμοποίησης, είτε στον σπλήνα και τους λεμφοειδείς αδένες κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Αντίθετα, οι επαγόμενες ή αλλιώς φλεγμονώδεις χημειοκίνες, εκφράζονται μόνο μετά από διέγερση του οργανισμού από κατάλληλα σήματα, όπως η είσοδος λιποπολυσακχαριτών και η έκφραση πρώιμων κυτταροκινών. Αυτές οι χημειοκίνες είναι υπεύθυνες για την οργάνωση της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού, διότι στρατολογούν τα λεμφοκύτταρα στα σημεία της φλεγμονής, σε κατεστραμμένους ιστούς και σε όγκους.

Σε όποια κατηγορία και αν ανήκουν, οι CXC χημειοκίνες είναι υποχρεωμένες να εκκριθούν στην κυκλοφορία του αίματος, να συνδεθούν επί του κατάλληλου υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου-στόχου και να εκδηλώσουν τη δράση τους.

A.2.2. Υποδοχείς των CXC χημειοκινών (CXC~~Rs~~)

Οι υποδοχείς των CXC χημειοκινών (CXC~~Rs~~) αποτελούν μέλη της οικογένειας των GPC υποδοχέων (G Protein-Coupled ~~Receptors~~). Κάθε CXC υποδοχέας εντοπίζεται κυρίως στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων, ενώ όλοι οι υποδοχείς έχουν κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Αποτελούνται από περίπου 350 αμινοξέα, έχουν ένα μικρό εξωκυττάριο N-τελικό άκρο, 7 διαμεμβρανικές α-έλικες, με 3 ενδοκυττάρια και 3 εξωκυττάρια υδρόφιλες θηλιές, και ένα ενδοκυττάριο C-τελικό άκρο. Η κάθε μία από τις δύο πρώτες εξωκυττάρια θηλιές, φέρει ένα συντηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία ενός δισουλφιδικού δεσμού ανάμεσα στις δύο πρώτες θηλιές. Το N-τελικό άκρο κάθε υποδοχέα είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη αναγνώριση της χημειοκίνης και τη σύνδεση με αυτή. Από την άλλη, το C-τελικό άκρο, το οποίο ευθύνεται για τη μεταγωγή του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου, συνδέεται με ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες και είναι πλούσιο σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών και την έναρξη ενός καταρράκτη αλυσιδωτών αντιδράσεων φωσφορύλωσης. Τέλος, χαρακτηριστικό

σημείο των CXC υποδοχέων αποτελεί μια κυτταροπλασματική τριπεπτιδική αλληλουχία, η οποία εντοπίζεται μετά από την 3^η διαμεμβρανική α-έλικα (στην 2^η ενδοκυττάρια θηλιά), και απαρτίζεται από ασπαραγινικό (D), αργινίνη (R) και τυροσίνη (Y). Καθώς οποιαδήποτε αλλαγή στην αλληλουχία DRY προκαλεί την απενεργοποίηση του υποδοχέα, η αλληλουχία θεωρείται βασική για τη χημειοταξία και την διέγερση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτό των MAP κινασών και της φωσφολιπάσης C (που οδηγεί σε αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου) [1].



Εικόνα 2. Δομή CXCR Υποδοχέα

Διαφοροποιημένη αναπαράγωγή από Molecular Biology of the Cell IV.2002

Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί 7 διαφορετικοί υποδοχείς χημειοκινών στα θηλαστικά (CXCR1-7). Καθώς πολλές χημειοκίνες ανταγωνίζονται ή συναγωνίζονται μεταξύ τους προκειμένου να συνδεθούν επί του ίδιου υποδοχέα, ενώ από την άλλη, μία και μόνο χημειοκίνη μπορεί να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς, οι υποδοχείς των CXC χημειοκινών διακρίνονται σε εκλεκτικούς και μη υποδοχείς. Οι εκλεκτικοί υποδοχείς προσδένουν μια συγκεκριμένη χημειοκίνη και ενεργοποιούνται μόνο από αυτή, ενώ οι μη-εκλεκτικοί υποδοχείς μπορούν να προσδένουν περισσότερες από μία χημειοκίνες και να ενεργοποιούνται από αυτές, διεγείροντας ενδεχομένως διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια [1].

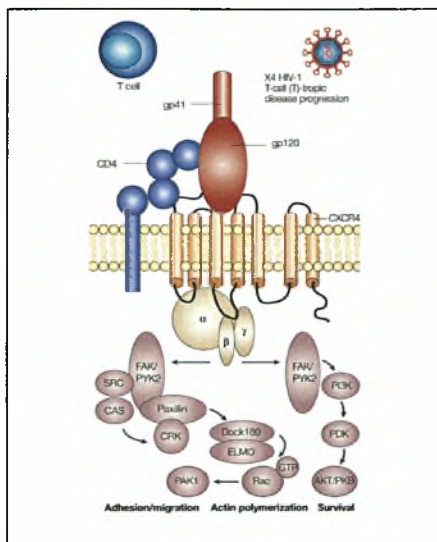
Από τους 7 αυτούς διαφορετικούς CXC υποδοχείς, ο υποδοχέας CXCR4, γνωστός και ως fusin, είναι ο υποδοχέας της υπό μελέτη χημειοκίνης CXCL12 (SDF-1). Ο

υποδοχέας αυτός εμφανίζει μια ευρεία κατανομή, καθώς εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, όπως στα ουδετερόφιλα, στα μονοκύτταρα, στα T και B κύτταρα, στα δενδριτικά κύτταρα, στα κύτταρα του Langerhans και στα μακροφάγα. Επιπλέον, μπορεί να εντοπισθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς επίσης και σε νευρικά κύτταρα.

Μια ενδιαφέρουσα ιδιότητα του CXCR4 είναι ότι αποτελεί και έναν από τους συν-υποδοχείς που χρησιμοποιεί ο ιός HIV-1, προκειμένου να εισέλθει στα κύτταρα-στόχους. Η είσοδος του HIV-1 στα κύτταρα-στόχους απαιτεί διαδοχικές αλληλεπιδράσεις μιας γλυκοπρωτεΐνης της επιφάνειας του ιικού φακέλου, της gp120, τόσο με τον κύριο υποδοχέα του ιού, την πρωτεΐνη CD4, όσο και με τους συν-υποδοχείς του, CXCR4 και CCR5 ^[26-28], οι οποίοι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση στα λεμφοκύτταρα. Η δέσμευση της gp120 στον CD4 υποδοχέα οδηγεί σε **απόπτωση** των T λεμφοκυττάρων ^[29-32]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και κατά την αλληλεπίδραση της γλυκοπρωτεΐνης αυτής με του υποδοχείς **χημειοκινών** CXCR4 και CCR5, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός καταρρέοντος μονοπατιών σηματοδότησης, τα οποία με τη σειρά τους συνεισφέρουν στη **χαρακτηριστική** δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, που παρατηρείται μετά από μόλυνση με τον HIV-1 ^[33-34].

Όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί, οι υποδοχείς των χημειοκινών είναι συζευγμένοι με ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες, μέσω των οποίων ενεργοποιείται μια ποικιλία ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η γλυκοπρωτεΐνη gp120, μιμούμενη τη δράση της χημειοκίνης SDF-1α, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα CXCR4 (ή τον CCR5) και μπορεί να ενεργοποιήσει απευθείας τις ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες ^[35], πυροδοτώντας βασικά μονοπάτια σηματοδότησης, όπως αυτά της απελευθέρωσης ιόντων Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρια αποθήκες, την PI3 κινάση και το μονοπάτι των Erk-1/2 MAPK. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση της gp120 με τον CXCR4 οδηγεί σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η οποία βοηθά στη εξάπλωση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο. Ειδικότερα, η έκφραση αυτής της γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου του HIV-1 αποδείχθηκε ότι προκαλεί, μέσω του CXCR4 υποδοχέα, διέγερση της κινάσης εστιακών προσκολλήσεων (FAK) και της πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης-2 (PYK2), οι οποίες

με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η παξιλλίνη και το μόριο-προσαρμογέα Crk. Δημιουργείται έτσι ένα σύμπλεγμα, το οποίο προάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία μιας «ιολογικής σύναψης» μεταξύ CD4⁺ CXCR4 κυττάρων, διευκολύνοντας έτσι την είσοδο του ιού στα T-λεμφοκύτταρα [36].



Εικόνα 3. Είσοδος του HIV στα T-κύτταρα μέσω του CXCR4


Αναπαράγωγή από <http://www.nature.com/nrm/journal/v5/n12/images/nrm1529-f3.jpg>

Ένας ακόμη CXC υποδοχέας, ο οποίος αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως ορφανός υποδοχέας, και πρόσφατα έχουν παρουσιασθεί νέα πειραματικά δεδομένα πως έχει ως συνδέτη τον SDF-1, είναι ο CXCR7. Ο CXCR7 έχει αποδειχθεί ότι επάγει τη χημειοταξία στα T λεμφοκύτταρα, ως απόκριση στη χημειοκίνη CXCL12 (SDF-1), ενώ εντοπίζεται και στην επιφάνεια των B-κυττάρων μνήμης. Παρ' όλα αυτά, η μελέτη του CXCR7 είναι σε αρχικά πειραματικά στάδια, γι' αυτό και οι γνώσεις γύρω από τον υποδοχέα αυτό είναι περιορισμένες.

A.3. Χημειοκίνη SDF-1

A.3.1. Δομή της χημειοκίνης SDF-1

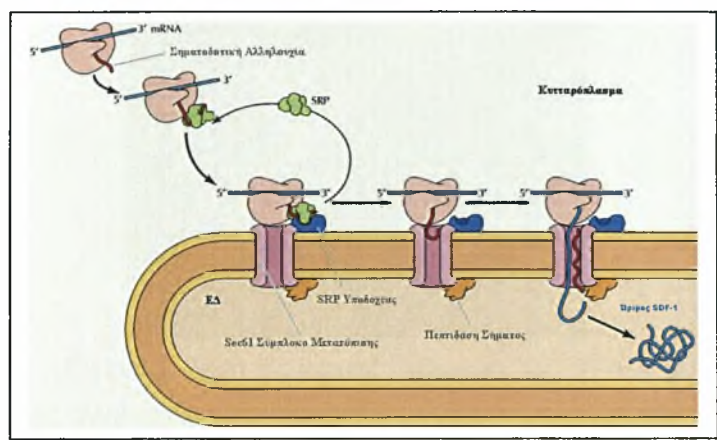
Ο SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor-1), είναι μία μικρή κυτοκίνη μεγέθους 8 kDa, η οποία ονομάζεται και chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12). Ανήκει στην οικογένεια των CXC χημειοκινών, των χημειοκινών εκείνων δηλαδή που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο συντηρημένων καταλοίπων κυστεϊνών στο αμινο-τελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης που χωρίζονται από ένα και μόνο τυχαίο αμινοξύ.

Το cDNA της χημειοκίνης CXCL12 αρχικά κλωνοποιήθηκε από κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών ποντικού και χαρακτηρίστηκε, αρχικά, ως αυξητικός παράγοντας της διέγερσης των προ-B-λεμφοκυττάρων. Σήμερα έχει αποδειχθεί ότι **SDF-1** αποτελεί έναν ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα T-λεμφοκύτταρα, τα πρόδρομα και τα ώριμα B-λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα .

Ο SDF-1 παράγεται σε δύο ισομορφές, τον SDF-1α και τον SDF-1β, οι οποίες κωδικοποιούνται από ένα και μόνο γονίδιο και αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Συγκεκριμένα, το mRNA του SDF-1α αποτελείται από τη συρραφή 3 εξονίων, διαθέτει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) 267 νουκλεοτιδικών βάσεων, κωδικοποιώντας έτσι μια πρωτεΐνη 89 αμινοξέων, ενώ το μέγεθος του 3' UTR είναι 1,5 kb. Από την άλλη, το mRNA του SDF-1β είναι μεγαλύτερο από αυτό του SDF-1α, δημιουργείται από τη συρραφή 4 εξονίων, έχει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 279 νουκλεοτιδικών βάσεων, κωδικοποιώντας έτσι μία πρωτεΐνη 93 αμινοξέων. Σε αντίθεση με το 3' UTR του SDF-1α, ο SDF-1β διαθέτει ένα μεγαλύτερο 3' UTR μεγέθους 3,1 kb ^[38]. Παράλληλα, έχουν ταυτοποιηθεί και 4 επιπλέον ισομορφές του SDF-1, οι γ, δ, ε και θ, οι οποίες αποτελούν και αυτές προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, αλλά πέραν του γεγονότος ότι παρουσιάζουν χημειοτακτική δραστηριότητα, ο ρόλος τους δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί ^[39].

Μετά τη μεταγραφή του γονιδίου του SDF-1α και τη μετάφραση του mRNA που προκύπτει, το παραγόμενο πολυπεπτίδιο αναγνωρίζεται από το σωματίδιο αναγνώρισης σήματος SRP (**S**ignal **R**ecognition **P**article) και μεταφέρεται στο

ενδοπλασματικό δίκτυο. Εκεί πραγματοποιείται, με τη δράση κατάλληλης πεπτιδάσης και την αποκοπή της σηματοδοτικής αλληλουχίας, μήκους 21 αμινοξέων, η ωρίμανση της πρωτεΐνης, ακολουθούμενη από την έκκριση του ώριμου SDF-1α (πρωτεΐνη 68 αμινοξέων).

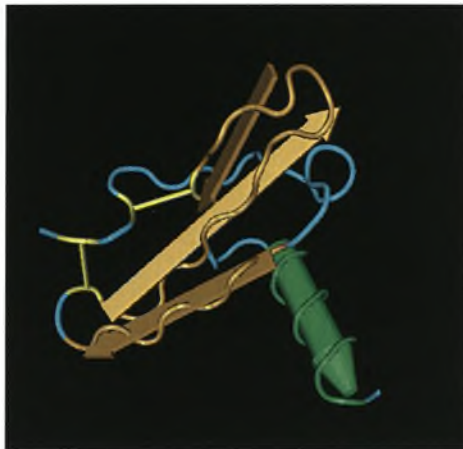


Εικόνα 4. Παραγωγή του Όριμου SDF-1

Διαφοροποιημένη αναπαραγωγή από Molecular Biology of the Cell IV 2002

Ο SDF-1 έχει τη χαρακτηριστική δομή των CXC-χημειοκινών. Αποτελείται δηλαδή από ένα ανοργάνωτο N-τελικό άκρο, μία 3₁₀ έλικα, 3 αντιπαράλληλα β-φύλλα, τα οποία ακολουθούνται από μία α-έλικα. Η περιοχή του N-τελικού άκρου του SDF-1, και συγκεκριμένα τα 8 κατάλοιπα αμινοξέων πριν την πρώτη **κυστεΐνη**, είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς σχηματίζουν μια θέση δέσμευσης με τον **υποδοχέα**. Η περιοχή αυτή επομένως παίζει ρόλο τόσο στην πρόσδεση του SDF-1 στον υποδοχέα του (CXCR4), όσο και στην ενεργοποίηση και λειτουργία του CXCR4. Παρ' όλα αυτά, μόνο 2 κατάλοιπα, η Lys-1 και η Pro-2, εμπλέκονται άμεσα στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Μεταλλάξεις στα 2 αυτά κατάλοιπα αμινοξέων οδηγούν σε απώλεια της ενεργότητας του υποδοχέα ^[40].

MNAKVVVVVLVLVLTALCLSDGKPVSLSYR**CPC**RRFFESHVARANVKHLKIL
NTPN**C**ALQIVARLKNNNRQV**C**IDPKLKWIQEYLEKALNK



Εικόνα 5: Δομή της ώριμης χημειοκίνης SDF-1 (CXCL12)

Επί της **αμνοξικής** αλληλουχίας επισημαίνονται, με θαλασσί το σηματοδοτικό πεπτίδιο, το οποίο αποκόπτεται, και με κίτρινο οι 4 συντηρημένες κυστεΐνες.

Αναπαραγωγή από Cn3D 4.1

A.3.2. Χαρακτηριστικά του γονιδίου του SDF-1

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την χημειοκίνη CXCL12 (SDF-1) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική περιοχή 10q11.1.

Πειραματικές μελέτες που αφορούσαν στην 5' περιβάλλουσα αλληλουχία του γονιδίου του SDF-1, αποκάλυψαν ότι ο υποκινητής του δεν διαθέτει ένα κανονικό TATA-box ^[41]. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία του TATA-box του SDF-1 ανήκει στο 2% των γονιδίων των οποίων οι υποκινητές έχουν κυτοσίνη αντί της αδεΐνης στη δεύτερη θέση της αλληλουχίας του TATA-box ^[42]. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται TATA-like και βρίσκεται στην πλειοψηφία των υποκινητών των CXC χημειοκινών. Η TATA-like αλληλουχία αυτή, λειτουργεί σαν ένα κανονικό TATA-box και αυτό υποδεικνύεται από το γεγονός ότι η θέση έναρξης της μεταγραφής εντοπίζεται 26 bp καθοδικά της αλληλουχίας αυτής, στην οποία έχει επίσης βρεθεί ότι δεσμεύονται, τόσο η πρωτεΐνη πρόσδεσης στο TATA-box (TBP), όσο και ο μεταγραφικός παράγοντας TFIID, που περιέχει την TBP. Επιπλέον, μετάλλαξη της

TATA-like αλληλουχίας οδηγεί σε σημαντική μείωση των επιπέδων της μεταγραφής. Μία δεύτερη θέση έναρξη της μεταγραφής εντοπίζεται στη θέση +16 [43].

Η 5' περιβάλλουσα αλληλουχία του γονιδίου του SDF-1 περιέχει νησίδα CpG, καθώς επίσης και πολλές συναινετικές αλληλουχίες πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Η δομή αυτή είναι πολύ κοινή για τους υποκινητές διαχειριστικών γονιδίων, τα οποία έχουν ιδιосύστατη έκφραση σε πολλούς ιστούς. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 θεωρείται κρίσιμος για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου του SDF-1, ενώ έχουν αναγνωρισθεί 15 υψηλά συντηρημένες αλληλουχίες δέσμευσης του Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου. Όλες αυτές οι θέσεις εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή του TATA-box και μέσα στην 5' UTR του mRNA του SDF-1 [43-44].

A.3.3. SDF-1 και CXC χημειοκίνες

Ο SDF-1 παρουσιάζει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά μεταξύ των CXC χημειοκινών. Πρώτον, το γονίδιο που τον κωδικοποιεί εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10q [38], σε αντίθεση με τα γονίδια των περισσοτέρων CXC χημειοκινών, τα οποία εντοπίζονται κυρίως στο χρωμόσωμα 4q [45]. Δεύτερον, η αμινοξική αλληλουχία της ώριμης πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά συντηρημένη ανάμεσα στον άνθρωπο και στον ποντικό, σε βαθμό που φτάνει το 99%. Η μοναδική διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη εντοπίζεται στην αλλαγή ενός και μόνο αμινοξέος: η βαλίνη (Val) αντικαθίσταται στη θέση 18 από ισολευκίνη (Ile). Αντίθετα, η ομοιότητα άλλων χημειοκινών ανάμεσα στον άνθρωπο και στον ποντικό αγγίζει κατά μέσο όρο το 69%. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της χημειοκίνης SDF-1, είναι το γεγονός ότι εκφράζεται ιδιосύστατα και ανιχνεύεται σε πολλά όργανα και ιστούς [38]. Οι περισσότερες χημειοκίνες παράγονται ως απόκριση σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα και ρυθμίζουν τη μετανάστευση και τη δραστηριότητα των λευκοκυττάρων στα σημεία φλεγμονής. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του SDF-1 δεν επηρεάζονται από φλεγμονώδη ερεθίσματα. Ειδικότερα, ο SDF-1 εκφράζεται διαρκώς σε κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών, γι' αυτό και παίζει πολύ κρίσιμο ρόλο στη

μεταφορά των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων στο σημείο αυτό. Εκτός του μυελού των οστών, ο SDF-1 παρουσιάζει ιδιοσύστατη έκφραση και σε πολλούς άλλους ιστούς, μεταξύ των οποίων είναι η καρδιά, το ήπαρ, οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος, οι μυς, ο σπλήνας και οι νεφροί. Τέλος, ο SDF-1 παίζει έναν πολύ κρίσιμο ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, γεγονός που είναι ασυνήθιστο για άλλες χημειοκίνες. Συγκεκριμένα, κατά την εμβρυογένεση, κατευθύνει τη μετανάστευση των κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος από το ήπαρ του εμβρύου στο μυελό των οστών, καθώς επίσης και το σχηματισμό των μεγάλων αιμοφόρων αγγείων. Επιπλέον η χημειοκίνη CXCL12 (SDF-1) είναι απαραίτητη για την οργανογένεση του καρδιαγγειακού και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η σημασία της στην εμβρυογένεση αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι ποντίκια *knocked-out* για το γονίδιο του SDF-1, πέθαιναν είτε πριν τη γέννησή τους είτε μέσα στην πρώτη ώρα ζωής ^[46-48].

A.3.4. Ενεργοποίηση του CXCR4 υποδοχέα και μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης από τον SDF-1

Ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η ενεργοποίηση του CXCR4 από τον SDF-1 περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά ο N-τελικός βρόγχος του SDF-1, και συγκεκριμένα τα αμινοξέα 12-17 ^[40], αναγνωρίζει το N-τελικό άκρο του υποδοχέα. Η αναγνώριση αυτή οδηγεί σε μία αρχική «χαλαρού τύπου» σύνδεση της χημειοκίνης με τον υποδοχέα της, με την οποία οι θέσεις σύνδεσης και ενεργοποίησης του CXCR4 έρχονται κοντά και επιτρέπεται έτσι η πρόσβαση του N-τελικού άκρου του SDF-1 σε μία αύλακα, η οποία δημιουργείται από τις διαμεμβρανικές έλικες του CXCR4. Στη συνέχεια, το N-τελικό άκρο, και ειδικότερα τα 8 πρώτα αμινοξέα του SDF-1, δεσμεύονται στην αύλακα αυτή, με αποτέλεσμα την επαγωγή αλλαγών στη διαμόρφωση των διαμεμβρανικών ελίκων του υποδοχέα, οι οποίες συμπλησιάζουν, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του υποδοχέα ^[49]. Ο διεγερμένος υποδοχέας ενεργοποιεί κατόπιν τη συνδεδεμένη σε αυτόν G-πρωτεΐνη, προκαλώντας αντικατάσταση του GDP της α-υπομονάδας από GTP. Η ενεργοποιημένη G-πρωτεΐνη δίδεται στις υπομονάδες G_{α_i} και $G_{\beta\gamma}$,

επάγοντας έτσι το μονοπάτι μεταγωγής σήματος. Το ότι ο CXCR4 επάγει τη μεταγωγή σήματος μέσω της $G_{\alpha i}$ πρωτεΐνης αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι η χημειοτακτική δραστηριότητα του SDF-1 μπλοκάρεται από την τοξίνη του κοκκύτη, ένα ένζυμο το οποίο καταλύει τη μη-αντιστρεπτή μεταφορά της ομάδας της ADP-ριβόζης του NAD^+ σε μια Cys της $G_{\alpha i}$ υπομονάδας, η οποία βρίσκεται 4 θέσεις πριν από το C-τελικό άκρο. Η ριβοσυλίωση στη θέση αυτή παραμποδίζει τη σύνδεση υποδοχέα- G_i πρωτεΐνης, καθελώνοντας την G_i -πρωτεΐνη στην GDP κατάσταση, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση της $G_{\alpha i}$ -υπομονάδας.

Η σύνδεση του SDF-1 στον υποδοχέα του CXCR4 οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη διαφόρων μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης, καθώς επίσης και πολλά μόρια-τελεστές, τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη χημειοταξία, τη μετανάστευση και την προσκόλληση. Τα σημαντικότερα μονοπάτια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση μέσω του CXCR4 περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση συστατικών εστιακών προσκολλήσεων, των ERK1 και 2 (Extracellular-Signal Regulated Kinases 1 and 2), της φωσφολιπάσης C- γ (PLC- γ), της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), της 3-κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3-K), όπως επίσης και ενεργοποίηση της ροής ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες και του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B (Nuclear Factor κ B).

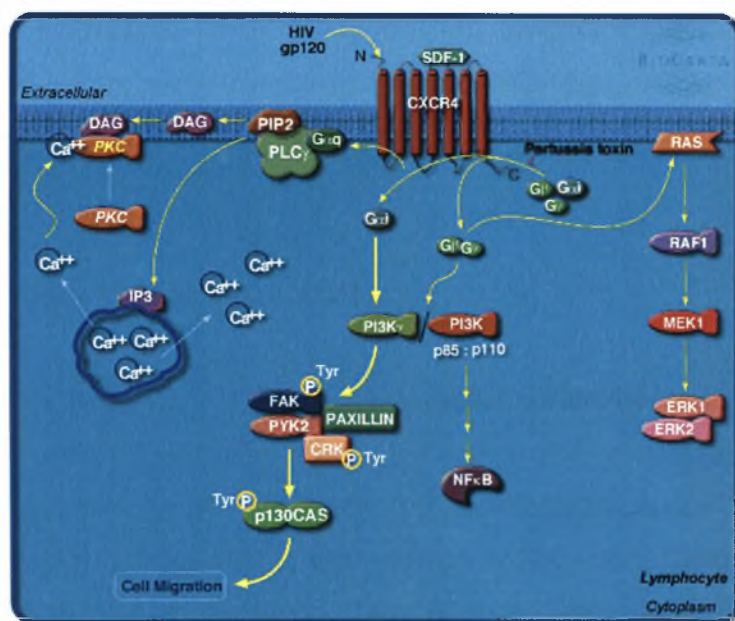
Αναλυτικότερα, ένα ιδιαίτερα σημαντικό μονοπάτι το οποίο ενεργοποιείται από τον SDF-1 είναι αυτό που οδηγεί στον πολυμερισμό της ακτίνης, και κατά συνέπεια στην ενίσχυση της κινητικότητας των κυττάρων. Πολλές κυτοκίνες ρυθμίζουν το σχηματισμό και τη λειτουργία των εστιακών προσκολλήσεων. Οι προσκολλήσεις αυτές είναι δομές του κυτταροσκελετού, οι οποίες σχηματίζουν επαφές με το εξωκυττάριο στρώμα. Αλλαγές στη δομή του κυτταροσκελετού της ακτίνης έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση των συστατικών εστιακής προσκόλλησης ^[50-51]. Η δέσμευση του SDF-1 επί του υποδοχέα του οδηγεί, μέσω της ενεργοποίησης της $G_{\alpha i}$ υπομονάδας μιας G πρωτεΐνης, στην ενεργοποίηση της PI3-K, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στη φωσφορυλίωση της κινάσης RAFTK (Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase or Pyk2) και της κινάσης FAK (Focal Adhesion Kinase) ^[52]. Οι φωσφορυλιωμένες RAFTK και FAK αλληλεπιδρούν και συνδέονται με την επίσης φωσφορυλιωμένη, από την PI3-K, πρωτεΐνη του

κυτταροσκελετού παξιλλίνη, καθώς επίσης και με το μόριο-προσαρμογέα Crk. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής είναι η δημιουργία ενός συμπλέγματος το οποίο αλληλεπιδρά, μέσω SH3 περιοχών, με το μόριο-προσαρμογέα p130Cas και το φωσφορυλιώνει. Η φωσφορυλίωση προάγει τη μετατόπιση του p130Cas σε σημεία εστιακών προσκολλήσεων και σηματοδοτεί την μετανάστευση των κυττάρων ^[53-55].

Η ενεργοποίηση της κινάσης PI3, οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης AKT. Η ενεργοποίηση του «καθοδικού» αυτού τελεστή της PI3-K έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση, και κατά συνέπεια ενεργοποίηση, μιας ποικιλίας ενδοκυτταρικών στόχων, που βασική λειτουργία τους είναι η αναστολή της απόπτωσης και η παρατεταμένη κυτταρική επιβίωση, ειδικά σε περιπτώσεις καρκινικών κυττάρων ^[56-57]. Ένας βασικός στόχος της κινάσης AKT είναι ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NFκB. Ο NFκB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών IκB ^[58-59]. Φωσφορυλίωση της IκB οδηγεί στην αποικοδόμησή της ^[58,60] και ο ελεύθερος πλέον NFκB μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων ^[58-61]. Έχει αποδειχθεί ότι ο NFκB ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων διαφόρων φλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και υποδοχών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, με το να δεσμεύεται στην περιοχή των υποκινητών τους ^[62]. Επίσης ο NFκB αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση σε διάφορους τύπους κυττάρων ^[63-64], ενώ είναι και ιδιαίτερα σημαντικός για την έκφραση των γονιδίων του HIV ^[65].

Το μονοπάτι των MAP κινάσων είναι ένα ακόμη μονοπάτι μεταγωγής σήματος το οποίο ενεργοποιείται από την πρόσδεση του SDF-1 στον CXCR4, η οποία οδηγεί στην επακόλουθη ενεργοποίηση της μικρής GTPάσης Ras. Η ενεργοποιημένη Ras επάγει τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης Raf, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την MEK, μία MAPK κινάση. Τελικά η ενεργοποιημένη MEK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MAP κινάσες ERK1 και 2 (Extracellular-Signal Regulated Kinases 1 and 2). Οι ενεργοποιημένες MAP κινάσες μπορούν να φωσφορυλιώσουν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του Elk-1, ο οποίος αυξάνει την έκφραση γονιδίων που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων ^[66].

Ένα τελευταίο βασικό μονοπάτι το οποίο επίσης ενεργοποιείται από τον SDF-1, είναι αυτό της διέγερσης της ροής ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες, και κατά συνέπεια η διέγερση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Η διέγερση του CXCR4 οδηγεί σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C γ (PLC γ). Η PLC αποικοδομεί 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η πρώτη απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, και αφού προσδεθεί στους IP₃ υποδοχείς του ενδοπλασματικού δικτύου, οδηγεί σε άνοιγμα των καναλιών ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου, και τελικά σε απελευθέρωση και αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η DAG, παραμένει συνδεδεμένη στη μεμβράνη, και σε συνδιασμό με τα ιόντα ασβεστίου, ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) [67-68].



Εικόνα 6. Μονοπάτια Κυτταρικής Σηματοδότησης

Αναπαραγωγή από www.biocarta.com/pathfiles/cxcr4Pathway.asp

Εκτός από τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις G-πρωτεΐνες, η αλληλεπίδραση του SDF-1 με τον CXCR4, οδηγεί και στη διέγερση μονοπατιών ανεξάρτητων από G-πρωτεΐνες. Ένα τέτοιο μονοπάτι είναι το μονοπάτι JAK/STAT. Αρχικά, η σύνδεση του SDF-1 επί του υποδοχέα του, οδηγεί σε επαναδιάταξη των αλυσίδων του CXCR4 και τελικά σε διμερισμό του [69]. Μόλις ο υποδοχέας

ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης του C-τελικού του άκρου, μέσω ενεργοποίησης και σύνδεσης του CXCR4 με τους υποδοχείς των JAK2 και JAK3 κινασών. Συγκεκριμένα, μετά την ενεργοποίηση του CXCR4, οι JAK2 και JAK3 συνδέονται με τον CXCR4 και ενεργοποιούνται μέσω trans-φωσφορυλίωσης. Οι ενεργοποιημένες JAKs στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα σε κατάλοιπα τυροσίνης, παρέχοντας έτσι θέσεις αλληλεπίδρασης για τις μεταγραφικές πρωτεΐνες STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Οι STATs, αφού συνδεθούν μέσω των SH2 περιοχών στον υποδοχέα, φωσφορυλιώνονται από τις JAK κινάσες σε κατάλοιπα τυροσίνης, και κατόπιν αποδεσμεύονται από τον υποδοχέα. Στη συνέχεια η ελεύθερη φωσφορυλιωμένη STAT διμερίζεται, το διμερές μετακινείται στον πυρήνα, όπου επάγει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων απόκρισης σε κυτοκίνες. Το μονοπάτι των JAK/STAT εμπλέκεται στην ενίσχυση της κινητικότητας των επιθηλιακών κυττάρων, προάγοντας κατά συνέπεια τη μετανάστευση και τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων [70-71].

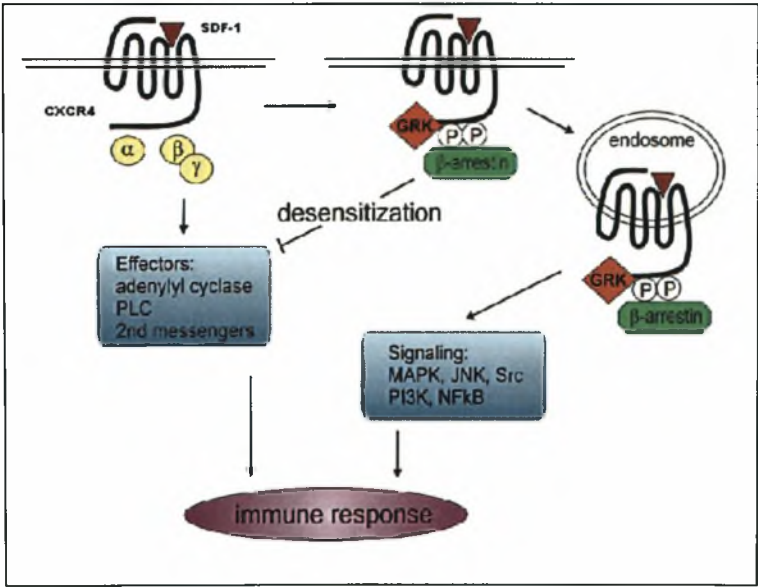
A.3.5. Απευαισθητοποίηση του CXCR4

Η σηματοδότηση μέσω των GPCRs καθορίζεται από την αυστηρή ισορροπία ανάμεσα στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, την απευαισθητοποίηση του και την επανέκφρασή του. Ο μηχανισμός απευαισθητοποίησης των GPCRs, είναι ένας σημαντικός μηχανισμός αντίστασης και, κατά συνέπεια, προστασίας του κυττάρου στη συνεχή δράση των χημειοκινών. Στην απευαισθητοποίηση των υποδοχέων εμπλέκονται η οικογένεια των κινασών των GPCR (GRKs) και οι αρρεστίνες [72-76]. Έχουν αναγνωρισθεί 6 μέλη της οικογένειας των GRKs (GRK1-6), με τις GRK2, -3, -5 και -6 να εκφράζονται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [73,76], ενώ, όσον αφορά την οικογένεια των αρρεστινών, δύο μέλη της περιορίζονται στους φωτοϋποδοχείς και οι β-αρρεστίνες 1 και 2 εκφράζονται σε πολλά κύτταρα.

Ο μηχανισμός απευαισθητοποίησης του υποδοχέα CXCR4 είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Αρχικά, η GRK-6 φωσφορυλιώνει το καρβοξυ-τελικό άκρο του

υποδοχέα σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, μία διαδικασία η οποία αυξάνει τη συγγένεια του υποδοχέα για τη σύνδεσή του με την κυτταροπλασματική β-αρρεστίνη 2. Η δέσμευση της β-αρρεστίνης 2 στον CXCR4 αναστέλλει την περαιτέρω αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την G πρωτεΐνη και διακόπτει κατά συνέπεια την κυτταρική σηματοδότηση. Το σύστημα των GRK6 – β-αρρεστίνη 2 προάγει την ενδοκυττάρωση του ανενεργού πλέον υποδοχέα σε κυστίδια κλαθρίνης. Ο ενδοκυτταρωμένος CXCR4 έπειτα, είτε μεταφέρεται στα λυσοσώματα προκειμένου να αποικοδομηθεί, είτε απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και τελικά επιστρέφει στην κυτταρική μεμβράνη [73,75,77,78].

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι β-αρρεστίνες, εκτός από τον ρόλο τους στην απευαισθητοποίηση του υποδοχέα, εμπλέκονται και στην κυτταρική σηματοδότηση. Το ενδοκυτταρωμένο σύμπλεγμα CXCR4-αρρεστίνης μπορεί να ενεργοποιεί σηματοδοτικές πρωτεΐνες, όπως οι ERK1 και 2, η p38 MAPK και η JNK. Επιπλέον οι αρρεστίνες λειτουργούν και ως σκαλωσιές, οι οποίες συνδέουν τους ενεργούς GPCRs με την κινάση τυροσίνης c-Src καθώς επίσης και με τα μονοπάτια της PI3-K - AKT και του **NfκB** [79-80].



Εικόνα 7. Μηχανισμός Απευαισθητοποίησης του CXCR4

Διαφοροποιημένη Αναπαραγωγή από Vroon et al., *Journal of Leukocyte Biology*.2006, 80:1214-1221

A.3.6. Σύνδεση του SDF-1 με γλυκοζαμινογλυκάνες του στρώματος

Η βιολογική δραστηριότητα των χημειοκινών επηρεάζεται από τη σύνδεσή τους με εξωκυττάρια γλυκοζαμινογλυκάνες του στρώματος. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι σουλφονυλιωμένες πολυσακχαριτικές αλυσίδες, οι οποίες προσδένονται ομοιοπολικά με μία κεντρική πρωτεΐνη, και σχηματίζουν μια πρωτεογλυκάνη ^[81]. Οι κυριότερες γλυκοζαμινογλυκάνες είναι η θειϊκή ηπαράνη, η ηπαρίνη, η θειϊκή δερματάνη, η θειϊκή χονδροϊτίνη και το υαλουρονικό οξύ ^[82-83].

Η αλληλεπίδραση των χημειοκινών με τις πρωτεογλυκάνες του εξωκυττάριου στρώματος, οδηγεί στην «ακίνητοποίησή» τους και κατά συνέπεια στην αύξηση της τοπικής συγκέντρωσής τους, ενισχύοντας έτσι την «παρουσίασή» τους στους υποδοχείς τους ^[84-85]. Ο SDF-1α αλληλεπιδρά, μέσω των θετικά φορτισμένων καταλοίπων του μορίου του, με τις αρνητικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες των GAGs ^[86]. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες χημειοκίνες, οι οποίες δεσμεύονται σε γλυκοζαμινογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης μέσω θετικά φορτισμένων αμινοξέων, τα οποία εντοπίζονται στην καρβοξυ-τελική α-έλικα ^[87-90], αυτό δεν παρατηρείται στον SDF-1α. Η C-τελική α-έλικα του SDF-1 φέρει αρνητικό φορτίο, το οποίο δεν ευνοεί τη σύνδεσή του με τις θειϊκές ηπαράνες της μεμβράνης ^[91-92]. Αντίθετα, τα βασικά αμινοξέα Lys24, His25 και Lys27, τα οποία εντοπίζονται στον πρώτο κλώνο του β-πτυχωτού φύλλου του μορίου του SDF-1, είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση του CXCL12 με στις γλυκοζαμινογλυκάνες της μεμβράνης ^[93].

Αν και ο SDF-1 αλληλεπιδρά με τα μόρια θειϊκής ηπαράνης με σχετικά υψηλή συγγένεια, η ισχυρότερη συγγένεια που παρουσιάζει για τον υποδοχέα του, CXCR4, επιτρέπει την εκλεκτική αλληλεπίδραση μαζί του, μέσω του ελεύθερου N-τελικού του άκρου. Η δέσμευσή του στις γλυκοζαμινογλυκάνες της κυτταρικής μεμβράνης απλώς οδηγεί στην «παρουσίαση» της λειτουργικής χημειοκίνης στην επιφάνεια των κυττάρων, και κατά συνέπεια, στην ενίσχυση της τοπικής συγκέντρωσης του SDF-1α, προκειμένου να δεσμευτεί και να ενεργοποιήσει τον CXCR4 υποδοχέα του, που εκφράζεται στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων ^[93].

B. Υλικά και Μέθοδοι

B.1. ΥΛΙΚΑ

B.1.1. Χημικά Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν την απαιτούμενη αναλυτική καθαρότητα και αγοράστηκαν από τις ακόλουθες εταιρείες:

Fluka (Seelzer, Germany), Applichem GmbH (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Riedel-de Haen (Seelzer, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), DUCHEFA (Haarlem, Nederland), Carlo Erba (Rodano, Italy), Genaxis Biotechnology (Kronberg/Taunus Germany), Cambrex (Rockland, USA), DIFCO (Detroit, USA), New England Biolabs (Hertfordshire, U.K), BioRad (Calif, USA), Macherey-Nagel GmbH & Co (Duren, Germany), Qiagen GmbH (Hilden, Germany) και Pharmacia Fine Chemicals (Upsala, Sweeden).

B.1.2. Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας

Οι μάρτυρες μεγέθους του DNA, τα φωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και οι έγχρωμοι μάρτυρες προσδιορισμού μοριακής μάζας πρωτεϊνών (Broad Range Prestain Protein **Markers**), που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και για τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (western blot), αγοράστηκαν από την εταιρία New England Biolabs (Hertfordshire, U.K).

Τα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη, καναμυκίνη, χλωραμφαινικόλη), που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες των βακτηρίων ήταν των εταιριών Genaxis Biotechnology (Kronberg/Taunus Germany) και DUCHEFA (Haarlem, Nederland).

Το πλασμίδιο pZero 2.1 ήταν της Invitrogen (Groningen, Nederland) και το pET-21b της εταιρίας Novagen (Darmstadt, Germany).

Η αλληλούχηση του DNA σε επιλεγμένα ανασυνδυασμένα πλασμίδια έγινε από τη MacroGen.

B.1.3. Ένζυμα και Αντισώματα

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI, BamHI, XhoI, XbaI και Sall αγοράστηκαν από την εταιρία New England Biolabs (Hertfordshire, U.K), ενώ η T4 DNA λιγάση ήταν της εταιρείας TaKaRa Shuzoco (Shiga, Japan). Η Taq2 πολυμεράση, που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, παρασκευάστηκε στο εργαστήριο μας από τη Δρ. Μερόπη Μάττα.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια σε ουρές πολύ-ιστιδινών (κλώνος His-6), αλλά και τα δεύτερα αντισώματα ενάντια στις ανοσοσφαιρίνες από ποντίκι και κουνέλι, με ομοιοπολικά δεσμευμένη υπεροξειδάση από αγριοράπανο, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (western blot), ήταν της εταιρίας Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

B.1.4. Εκκινητές Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Οι εκκινητές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να εξυπηρετούν την ενίσχυση του cDNA του SDF-1α και την ένθεση στα άκρα του θέσεων αναγνώρισης από επιλεγμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Η σύνθεση τους πραγματοποιήθηκε, κατόπιν παραγγελίας, στα εργαστήρια της VBC-Genomics.

B.1.5. Βιολογικά Υλικά

Για τα πειράματα κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* TOP10, ενώ τα πειράματα πρωτεϊνικής έκφρασης έγιναν σε κύτταρα *E. coli* BL21[DE3] και *E. coli* Rosetta[DE3]. Τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ήταν από πληθυσμούς ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

Τα κουνέλια, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση και την παρασκευή των πολυκλωνικών αντισωμάτων, αγοράστηκαν από κατάστημα πώλησης κατοικίδιων ζώων.

B.2 Μέθοδοι

B.2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χαρακτηρίζεται η *in vitro* διαδικασία ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA με πολλαπλούς κύκλους αντιγραφής με τη χρήση μιας θερμο-ανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί το DNA ως εκμαγείο, προκειμένου να συνθέσει ένα νέο συμπληρωματικό κλώνο. Για την πρόσδεση και έναρξη της δράσης της πολυμεράσης απαιτείται ένα μικρό, μονόκλωνο τμήμα DNA, το οποίο καλείται εκκινητής. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι συμπληρωματικοί της περιοχής έναρξης και λήξης της ακολουθίας-στόχου.

Μία παραλλαγή της **κλασσικής** αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αποτελεί η nested PCR . Στη **μέθοδο** αυτή, χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση του **επιθυμητού** τμήματος DNA. Οι εκκινητές ονομάζονται nested εκκινητές, καθώς το **δεύτερο** ζεύγος αυτών υβριδίζεται στο εσωτερικό του πρώτου PCR προϊόντος επιτρέποντας την ενίσχυση ενός δεύτερου προϊόντος PCR το οποίο είναι μικρότερο **από** το πρώτο. Το πλεονέκτημα της nested PCR είναι ότι ελαχιστοποιεί την **δημιουργία** μη-ειδικών PCR προϊόντων που προκύπτουν από τον υβριδισμό των εκκινητών σε λάθος περιοχές του DNA, καθώς οι πιθανότητες ενίσχυσης ενός μη-επιθυμητού τμήματος DNA και από τα δύο ζεύγη εκκινητών είναι ελάχιστες.

Η πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αρχικός κύκλος αποδιάταξης.

Το εκμαγείο DNA θερμαίνεται στους 94°C για 5 λεπτά και αποδιατάσσεται, σχηματίζοντας δυο μονόκλωνες αλυσίδες.

2. Ακολουθούν 35 κύκλοι αποδιάταξης – υβριδισμού - επιμήκυνσης προκειμένου να ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα DNA. Η ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος αυξάνεται λογαριθμικά κατά 2^{n-2} (όπου n = σύνολο κύκλων). Τα στάδια από τα οποία αποτελείται ο κάθε κύκλος είναι τα εξής:

2a. Το DNA θερμαίνεται στους 94°C για 1 λεπτό (αποδιάταξη).

2b. Η θερμοκρασία μειώνεται στους 60°C για 1 λεπτό (υβριδισμός).

Οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του μονόκλωνου DNA - στόχου. Η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδισμού καθορίζεται με βάση τη θερμοκρασία τήξης (Temperature of melting, T_m) των εκκινητών.

2c. Η διαδικασία ολοκληρώνεται στους 72°C (επιμήκυνση).

Η επιμήκυνση της ακολουθίας των εκκινητών γίνεται από τη θερμο - ανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq2), παρουσία των τεσσάρων απαιτούμενων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP και dGTP) και ιόντων Mg^{+2} , που είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Στο στάδιο αυτό, η DNA πολυμεράση συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα του κάθε κλώνου, προσθέτοντας νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή.

3. Διατήρηση της θερμοκρασίας στους 72°C προκειμένου να ολοκληρωθεί η τελική επέκταση του ενισχυμένου προϊόντος.

Στη συνέχεια ακολουθεί μια δεύτερη αντίδραση PCR με το δεύτερο ζεύγος εκκινητών (nested primers) στην οποία ως εκμαγείο χρησιμοποιείται το ενισχυμένο προϊόν από την πρώτη PCR. Συγκεκριμένα τα στάδια είναι τα εξής:

1. Αρχικός κύκλος αποδιάταξης.

Το ήδη ενισχυμένο PCR προϊόν θερμαίνεται στους 94° C για 5 λεπτά και αποδιατάσσεται, σχηματίζοντας δυο μονόκλωνες αλυσίδες.

2. Ακολουθούν 30 κύκλοι αποδιάταξης – υβριδισμού – επιμήκυνσης. Τα στάδια από τα οποία αποτελείται ο κάθε κύκλος είναι τα εξής:

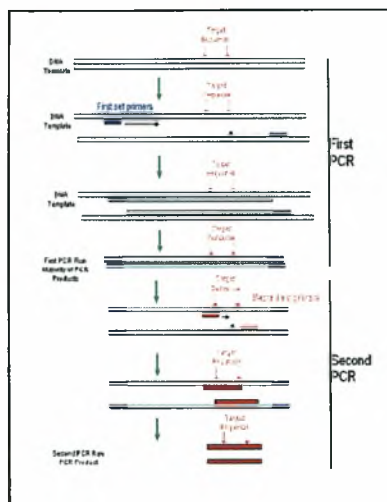
2a. Το DNA θερμαίνεται στους 94°C για 1 λεπτό (αποδιάταξη).

2b. Η θερμοκρασία μειώνεται στους 58°C για 1 λεπτό (υβριδισμός).

Οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του μονόκλωνου DNA - στόχου.

2c. Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C (επιμήκυνση).

3. Η θερμοκρασία διατηρείται στους 72°C προκειμένου να ολοκληρωθεί πλήρως η τελική επέκταση του ενισχυμένου προϊόντος.



Εικόνα 8: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) Nested
 Διαφοροποιημένη Αναπαραγωγή από www.pcrstation.com/nl/nested-pcr/

Η κάθε αντίδραση PCR αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:

Εκμαγείο DNA	2 μ l
Εκκινητής πρόσθιος	1.6 μ M
Εκκινητής ανάστροφος	1.6 μ M
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)	0.25 mM
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης	5 μ l
Mg ²⁺ - free (10 x)	
MgSO ₄	2 mM
DNA Πολυμεράση (Taq 2)	1 μ l

Πίνακας 2. Συστατικά PCR Αντίδρασης

Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι ίσος με 50 μ l και προκύπτει με την πρόσθεση κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου - απεσταγμένου νερού.

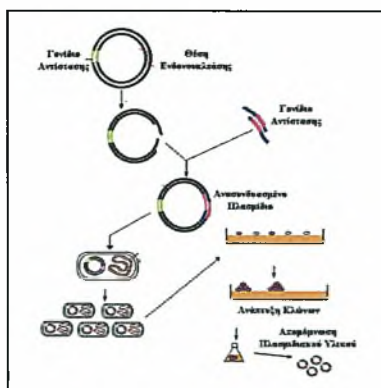
Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματη, προγραμματιζόμενη συσκευή PTC-200 Peltier Thermal Cycler της εταιρείας M.J. Research Inc., Massachusetts, USA.

B.2.2. Κλωνοποίηση Τμημάτων DNA σε Βακτηριακούς Φορείς – Αντίδραση Λιγάσης

Ο όρος κλωνοποίηση περιγράφει τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA που μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε οποιοδήποτε αυτόνομο γενετικό στοιχείο. Πρώτο βήμα της κλωνοποίησης αποτελεί η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η ανάλυση του τμήματος του DNA, ενώ το δεύτερο βήμα αυτής είναι η επιλογή ενός κατάλληλου φορέα, συνήθως πλασμιδιακού.

Τα πλασμίδια - φορείς είναι μικρά κυκλικά μόρια DNA και αποτελούν αυτόνομα εξωχρωμοσωμικά στοιχεία. Φέρουν τα εξής τρία χαρακτηριστικά: μία θέση έναρξης της αντιγραφής (ORI), ένα γονίδιο-μάρτυρα επιλογής (ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό) και θέσεις πέψης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που απαντώνται μόνο μία φορά στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).

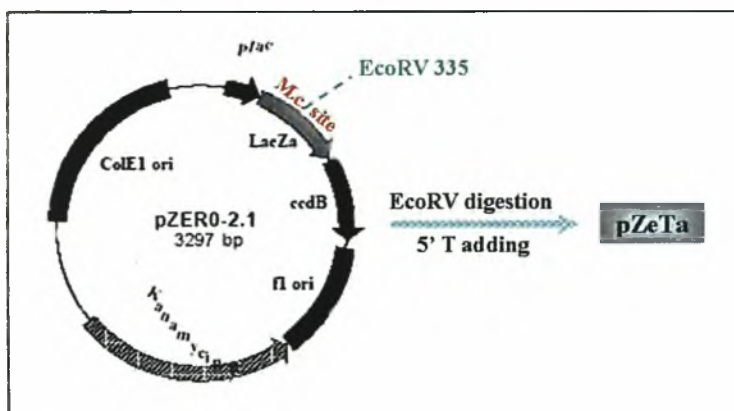
Το κλωνοποιούμενο τμήμα του DNA προέρχεται είτε από την **πέψη** κάποιου μεγαλύτερου αρχικού με ενδονουκλεάσες περιορισμού, είτε από την **ενίσχυση** μιας ακολουθίας με τη μέθοδο της PCR. Το τμήμα αυτό μπορεί να **έχει κολλώδη** ή τυφλά άκρα, ανάλογα με την ενδονουκλεάση περιορισμού ή τη **θερμο-ανθεκτική** DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Η Taq DNA πολυμεράση δημιουργεί συμπληρωματικά άκρα (με μια προεξέχουσα βάση A) σε **κάθε 3' άκρο**. Η κλωνοποίηση στηρίζεται στη σύνδεση των συμβατών άκρων του φορέα και του τμήματος του DNA, με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού **που καταλύεται** από την T4 DNA λιγάση.



Εικόνα 9. Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε Πλασμιδιακό Φορέα

Διαφοροποιημένη αναπαραγωγή από www.access/excellence.org/RCV/LGG/images/PLASMID

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε, είναι μία τροποποιημένη μορφή του πλασμιδιακού φορέα pZero 2.1 (Invitrogen), ο pZeTa. Συγκεκριμένα, το πλασμίδιο pZero2.1 αρχικά επώαστηκε με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV, η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε κατάλληλη αντίδραση προσθήκης μιας βάσεως T, έτσι ώστε να εμφανίσει 5' T άκρα. Η παραγωγή του pZeTa κρίνεται απαραίτητη διότι η Taq2 πολυμεράση, που χρησιμοποιείται κατά την PCR, δημιουργεί προϊόντα με 3' A άκρα. Κατά συνέπεια, η κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR διευκολύνεται με τον υβριδισμό μεταξύ των 3' A προεκβολών του προϊόντος της PCR και των 3' T προεκβολών του pZeTa (TA cloning). Λόγω του ότι ο φορέας pZeTA περιέχει επίσης το γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη, τα ανασυνδυασμένα στελέχη επιλέγονται σε τρυβλία που περιέχουν 50 µg/ml καναμυκίνη.



Εικόνα 10. pZero2.1 / Δημιουργία pZeTa

Η κάθε αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20 µl ως εξής:

- ❖ Αναμειγνύονται 2 µl από το ενισχυμένο τμήμα DNA που προέκυψε από την PCR με 50 ng πλασμιδιακού φορέα (pZeTA), 2 µl ρυθμιστικού διαλύματος T4 DNA λιγάσης 10x (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml αλβουμίνης βόειου ορού) και αποστειρωμένο H₂O μέχρι τη συμπλήρωση του τελικού όγκου των 20 µl
- ❖ Ακολουθεί επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- ❖ Τέλος προστίθεται 1µl T4 DNA λιγάσης (350 units / µl)

❖ Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 ώρες και στη συνέχεια στους 4° C ολονύκτια

B.2.3. Παρασκευή παγωμένων επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Top10)

Η τεχνική αυτή έχει ως στόχο την επαγωγή της «επιδεκτικότητας» των βακτηριακών κυττάρων ώστε να είναι δυνατή η εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε αυτά και πραγματοποιείται ως εξής:

- ❖ Εμβολιάζονται 3 ml θρεπτικού υλικού TYM (0.5 % w/v εκχύλισμα ζύμης, 2 % w/v τρυπτόνη, 0.584% w/v NaCl, 10 mM MgSO₄) με βακτηριακά κύτταρα
- ❖ Η καλλιέργεια επωάζεται για 12-16 ώρες στους 37° C, υπό ανάδευση
- ❖ Ακολουθεί εμβολιασμός 3 ml νέου θρεπτικού υλικού TYM με 30 μl από την παραπάνω καλλιέργεια (αραίωση 1:100) και ακολουθεί επώαση για 2 με 3 ώρες στους 37° C
- ❖ 2.5 ml από την καλλιέργεια προστίθενται σε 500 ml θρεπτικού υλικού TYM (αραίωση 1:200)
- ❖ Η νέα καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C, μέχρις ότου η απορρόφηση στα 600 nm (OD₆₀₀) να φθάσει στην περιοχή 0.35-0.4
- ❖ Η καλλιέργεια αφήνεται σε πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 4000 rpm (κεφαλή GSA) για 10 λεπτά στους 4° C
- ❖ Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 250 ml διαλύματος TFB1, pH 7.0 (30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15 % v/v γλυκερόλη) και αφήνονται στον πάγο για 10 λεπτά
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000 rpm (4° C)
- ❖ Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται τελικά σε 25 ml διαλύματος TFB2, pH 7.0 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 20 % v/v γλυκερόλη)
- ❖ Το αιώρημα επωάζεται για 1 ώρα στον πάγο
- ❖ Τελικά, τα αιωρημένα κύτταρα χωρίζονται σε κλάσματα των 200 μl, τα οποία ψύχονται ταχέως και διατηρούνται στους -80° C

B.2.4. Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Top10 ή BL21[DE3])

- ❖ Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα Top10 (200μl) αναμειγνύονται με 5μl προϊόντος αντίδρασης λιγάσης ή πλασμιδιακού DNA
- ❖ Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά
- ❖ Τα κύτταρα υπόκεινται σε θερμικό σοκ σε υδατόλουτρο του οποίου η θερμοκρασία έχει ρυθμιστεί στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα ακριβώς
- ❖ Αμέσως τοποθετούνται στον πάγο και ψύχονται για 1-2 λεπτά
- ❖ Προστίθενται 800μl θρεπτικού υλικού 2XYT (1.0% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1.6% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v NaCl)
- ❖ Οι καλλιέργειες επωάζονται για 45 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση (200rpm), ώστε τα κύτταρα να εκφράσουν το γονίδιο της αντίστασης στο αντιβιοτικό επιλογής
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 1 λεπτό και το υπόλειμμα των κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλίο θρεπτικού άγαρ 2XYT, το οποίο επίσης περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής
- ❖ Το τρυβλίο μεταφέρεται για επώαση στους 37°C για 12 – 16 ώρες, ώστε να αναπτυχθούν οι ανθεκτικές στο αντιβιοτικό αποικίες

B.2.5. Παρασκευή μικροποσοτήτων πλασμιδιακού DNA (mini-preps)

- ❖ Βακτηριακή αποικία μεταφέρεται σε 3 – 4 ml θρεπτικού υλικού 2XYT το οποίο περιέχει και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής σε αποστειρωμένο γυάλινο σωλήνα. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση (200rpm) για 12 – 16 ώρες.
- ❖ 1.5 ml της καλλιέργειας μεταφέρονται σε μικροσωληνάριο Eppendorf και φυγοκεντρούνται στις 12000rpm για 1 λεπτό
- ❖ Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 400 μl διαλύματος STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)
- ❖ Προστίθενται 35 μl πυκνού διαλύματος λυσοζύμης (10 mg/ml) και το περιεχόμενο αναδεύεται ήπια

- ❖ Πραγματοποιείται επώαση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 5 λεπτά
- ❖ Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 50 δευτερόλεπτα ακριβώς
- ❖ Μεταφορά σε πάγο για 5 λεπτά
- ❖ Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 λεπτά
- ❖ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό μικροσωληνάριο Eppendorf και προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλης
- ❖ Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm για 5 λεπτά
- ❖ Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα πλένεται με 500 μl παγωμένης 70% αιθανόλης
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά
- ❖ Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει (10 – 15 λεπτά)
- ❖ Τέλος το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε 50 μl διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) ή H₂O και αποθηκεύεται στους -20°C

B.2.6. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με χρήση στήλης

Ο καθαρισμός πλασμιδιακού DNA έγινε με τη χρήση του συστήματος NucleoBond Xtra Midi Kit της εταιρίας Macherey – Nagel GmbH & Co (Duren, Germany). Η διαδικασία καθαρισμού περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- ❖ Μία αποικία βακτηρίων προστίθεται σε 4 ml θρεπτικού υλικού 2XYT παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής (αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml) και η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm) για 12 – 16 ώρες
- ❖ Γίνεται ενοφθαλμισμός νέας καλλιέργειας 100 ml 2XYT η οποία περιέχει το αντιβιοτικό επιλογής με κατάλληλη αραίωση της αρχικής καλλιέργειας (αραίωση 1:1000) και επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm) για 12 – 16 ώρες
- ❖ Τα κύτταρα συλλέγονται με δεκάλεπτη φυγοκέντρηση στις 2.500 rpm στους 4°C
- ❖ Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται πλήρως σε 12 ml διαλύματος RES

- ❖ Προστίθενται 12 ml διαλύματος λύσης LYS
- ❖ Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μίγματος και στη συνέχεια επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ❖ Προστίθενται 12 ml διαλύματος εξουδετέρωσης NEU και το μίγμα αναδεύεται ήπια
- ❖ Το μίγμα προστίθεται σε μία NucleoBond Xtra στήλη, η οποία περιέχει ενσωματωμένο και το φίλτρο, και έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 12 ml διαλύματος εξισορρόπησης EQU
- ❖ Η στήλη πλένεται με 5 ml διαλύματος εξισορρόπησης EQU
- ❖ Το φίλτρο απομακρύνεται και η στήλη πλένεται με 8 ml διαλύματος πλύσης WASH
- ❖ Το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με 5 ml διαλύματος έκλουσης ELU
- ❖ Πραγματοποιείται κατακρίμνηση του πλασμιδιακού DNA με την προσθήκη 3.5 ml ισοπροπανόλης. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε αναδευτήρα vortex, στη συνέχεια το δείγμα αφήνεται για 2 λεπτά και έπειτα μεταφέρεται στους 4°C ολονύκτια
- ❖ Την επομένη πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά
- ❖ Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται με 1 ml παγωμένης 70% αιθανόλης
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου
- ❖ Το ίζημα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA επαναιωρείται σε 150 μl διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA)

Προκειμένου να αποκτήσουμε μεγαλύτερης καθαρότητας πλασμιδιακό DNA, το δείγμα θα καθαριστεί με χρήση μίγματος φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι επιτυγχάνεται καλύτερη απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το δείγμα όταν χρησιμοποιούνται περισσότεροι του ενός οργανικοί διαλύτες. Στη συνέχεια ακολουθεί νέα εκχύλιση με διάλυμα χλωροφορμίου (SEVAG) προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της φαινόλης. Η διαδικασία που ακολουθείται για τον καθαρισμό έχει ως εξής:

- ❖ Στο δείγμα προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και αναδεύεται ισχυρά
- ❖ Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm για 1 λεπτό
- ❖ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο (υδατική φάση)
- ❖ Προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία
- ❖ Ακολουθεί εκχύλιση με ίσο όγκο διαλύματος SEVAG (96% v/v χλωροφόρμιο, 4% v/v ισοαμυλική αλκοόλη) και καλή ανάδευση
- ❖ Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm για 1 λεπτό και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο
- ❖ Προστίθενται 3 ml γλυκογόνου και αναδεύονται
- ❖ Στη συνέχεια προστίθεται CH₃COONa (1.5M, pH 5.5) σε C_{τελ} = 0.3M και ίσος όγκος ισοπροπανόλης
- ❖ Το περιεχόμενο αφήνεται στους -20°C ολονύκτια
- ❖ Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm για 10 λεπτά
- ❖ Το ίζημα πλένεται με παγωμένη 70% αιθανόλη και έπειτα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm για 5 λεπτά
- ❖ Ακολουθεί δεύτερη πλύση του ιζήματος με παγωμένη 70% αιθανόλη
- ❖ Τελικά το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500 ml H₂O

B.2.7. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA

Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά. Η αρχή του φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού βασίζεται στο γεγονός ότι οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης απορροφούν ισχυρά στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος. Επομένως τα διαλύματα νουκλεϊκών οξέων απορροφούν στο υπεριώδες, με μέγιστο στα 260 nm. Η διαδικασία είναι η εξής:

- ❖ Μία μικρή ποσότητα του δείγματος αραιώνεται με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό

- ❖ Μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm
- ❖ Με βάση το γεγονός ότι μια μονάδα οπτικής πυκνότητας (OD) στα 260 nm αντιστοιχεί σε 50 µg/ml διαλύματος DNA, προσδιορίζεται η ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος στο άγνωστο δείγμα

Ο βαθμός καθαρότητας των δειγμάτων εκτιμάται από τον λόγο των οπτικών πυκνοτήτων στα 260 nm προς τα 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Δείγματα υψηλής καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων έχουν λόγο OD_{260}/OD_{280} ίσο με 1.8.

B.2.8. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι βακτηριακά ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, οι οποίες καλούνται θέσεις αναγνώρισης- πέψης και πέπτουν το δίκλωνο μόριο DNA με επαναλήψιμο τρόπο. Οι περισσότερες ενδονουκλεάσες περιορισμού αναγνωρίζουν και πέπτουν το DNA μέσα σε μια αλληλουχία τεσσάρων ή έξι νουκλεοτιδίων και ανάλογα με τον τρόπο πέψης δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα. Ως 1 μονάδα (unit) περιοριστικού ενζύμου ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1µg υποστρώματος DNA σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 µl, μετά από επώαση για 1 ώρα.

Στην αντίδραση πέψης του DNA προστίθεται το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο το ένζυμο περιορισμού παρουσιάζει τη βέλτιστη δραστητικότητα, σε τελική συγκέντρωση 1X, RNase A και αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) σε τελική συγκέντρωση 0.1 mg/ml. Η ενδονουκλεάση περιορισμού προστίθεται τελευταία και η ποσότητα της δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης, προκειμένου να αποφευχθεί το φαινόμενο της μη ειδικής πέψης (star activity) που μπορεί να παρατηρηθεί λόγω υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης (> 5%) στο μίγμα της αντίδρασης (τα ένζυμα διατηρούνται σε διάλυμα 50% γλυκερόλης προκειμένου να μην παγώνουν στους -20°C). Ο τελικός όγκος του μίγματος είναι 20 µl και η αντίδραση πραγματοποιείται για δύο ώρες στους 37°C.

Σε περίπτωση πέψης του DNA με δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού, η προσθήκη των ενζύμων γίνεται ταυτόχρονα όταν αυτά είναι συμβατά στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και εμφανίζουν σ' αυτό τη βέλτιστη δραστηριότητά τους, ή διαδοχικά όταν δεν έχουν συμβατά ρυθμιστικά διαλύματα.

B.2.9. Καλλιέργειες των στελεχών E.coli BL21(DE3) και Rosetta (DE3)

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έκφραση του SDF-1α, χρησιμοποιήθηκαν για μεταμόρφωση με τον ανασυνδυασμένο φορέα pX-SDF-1α (Βλ. Παράγραφο Γ.3.3), κύτταρα E.coli, των στελεχών BL21(DE3) και Rosetta (DE3) [για πληροφορίες για τον γενότυπο των στελεχών Βλ. Invitrogen).

Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό 2XYT (1.0% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1.6 % w/v τρυπτόνη, 0.5 % w/v NaCl) στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Τα αντιβιοτικά επιλογής τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- ❖ Αμπικιλλίνη, σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml
- ❖ Καναμυκίνη, σε τελική συγκέντρωση 50 µg/ml
- ❖ Χλωραμφαινικόλη, σε τελική συγκέντρωση 25 µg/ml

B.2.9.1. Έλεγχος της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

Αρχικά τα στελέχη E.coli BL21(DE3) και Rosetta(DE3) μετασχηματίζονται με το πλασμίδιο pX-SDF1α. Ως αρνητικό control χρησιμοποιούνται μετασχηματισμένα στελέχη E.coli BL21(DE3) με άκοπο φορέα pET21b. Τα στελέχη BL21(DE3) αναπτύσσονται σε τρυβλία 2XYT – άγαρ που περιέχουν και αμπικιλλίνη, ενώ τα στελέχη Rosetta(DE3) αναπτύσσονται παρουσία αμπικιλλίνης και χλωραμφαινικόλης (καθώς φέρουν επιπλέον το πλασμίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη), στους 37°C για 12 – 16 ώρες. Στη συνέχεια μία αποικία από το κάθε τρυβλίο μεταφέρεται σε 4 ml θρεπτικού υλικού 2XYT που περιέχει και το αντίστοιχο αντιβιοτικό επιλογής. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C για 12 –

16 ώρες υπό ανάδευση (200 rpm). Στη συνέχεια 200 μl από την κάθε καλλιέργεια εμβολιάζονται σε 1.8 ml θρεπτικού υλικού 2XYT (αραίωση 1:10) που περιέχουν και την απαραίτητη ποσότητα αντιβιοτικού. Οι νέες καλλιέργειες επωάζονται για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση (200rpm). Έπειτα προστίθεται 1mM ισοπροπυλοθειογαλακτοσιδίου (IPTG) προκειμένου να επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης. Η επώαση των καλλιεργειών συνεχίζεται για ακόμη 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση (200rpm). Κατόπιν 1 ml από την κάθε καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωληνάρια errendorf, φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις 12000 rpm και στα ιζήματα προστίθενται 300 μl διαλύματος επιστοίβαξης SDS 1.5x. Τα δείγματα βράζονται για 5 – 7 λεπτά και διατηρούνται στους -20°C. Οι πρωτεΐνες μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου.

B.2.9.2. Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τα στελέχη E.coli BL21(DE3) και Rosetta (DE3)

Μία αποικία από τα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pX-SDF1α στελέχη BL21(DE3) και Rosetta(DE3) μεταφέρεται σε 4 ml θρεπτικού υλικού 2XYT που περιέχει και το αντίστοιχο αντιβιοτικό επιλογής. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C για 12 – 16 ώρες υπό ανάδευση (200 rpm). Κατόπιν 2.5 ml από την κάθε καλλιέργεια εμβολιάζονται σε 250 ml θρεπτικού υλικού 2XYT (αραίωση 1:100), όπου προηγουμένως έχει προστεθεί και το κατάλληλο αντιβιοτικό. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (200rpm) μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση στα 600 nm (OD_{600}) να γίνει 0.5 – 0.6. Όταν αυτό συμβεί συλλέγεται 1 ml από την κάθε καλλιέργεια σε σωληνάριο errendorf, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000 rpm, απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθενται 300 μl διαλύματος επιστοίβαξης SDS 1.5x (time 0). Αμέσως στο σημείο αυτό λαμβάνει χώρα επαγωγή με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Δείγματα του 1 ml από την κάθε καλλιέργεια συλλέγονται επίσης στα 30 λεπτά μετά την επαγωγή, στη 1 ώρα, στις 2 ώρες, στις 4 ώρες και στις 6 ώρες. Τελικά τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6000 rpm (κεφαλή GSA) στους 4°C. Τα υπερκείμενα αποχύνονται και τα ιζήματα πλένονται δύο φορές με

αιώρηση σε 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) και φυγοκέντρηση στις παραπάνω συνθήκες. Τα πλυμένα ιζήματα διατηρούνται στους -20°C.

B.2.9.3. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης από τα στελέχη E.coli BL21(DE3)

Μία αποικία από τα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pX-SDF1α στελέχη BL21(DE3) μεταφέρεται σε 50 ml θρεπτικού υλικού 2XYT που περιέχει και αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm) ολονύκτια. Την επομένη, χρησιμοποιούνται από 10 ml της καλλιέργειας για τον εμβολιασμό 500 ml θρεπτικού υλικού 2XYT παρουσία αμπικιλίνης (αραίωση 1:50). Η κάθε καλλιέργεια των 500ml αναπτύσσεται στους 37°C κάτω από συνθήκες έντονης ανάδευσης, μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600nm να γίνει 0.5 – 0.6. Όταν αυτό πραγματοποιηθεί προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Ακολουθεί περαιτέρω επώαση για 6 ώρες υπό τις ίδιες συνθήκες και έπειτα τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6000 rpm (κεφαλή GSA) στους 4°C. Κατόπιν πραγματοποιείται απόχυση των υπερκλεισμένων και διπλή πλύση των ιζημάτων με αιώρηση σε 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) και φυγοκέντρηση στις παραπάνω συνθήκες. Τα ιζήματα διατηρούνται στους -20°C.

B.2.10. Απομόνωση και καθαρισμός βακτηριακών εγκλειστών

Καθώς η πρωτεΐνη που μελετάται εντοπίζεται στα βακτηριακά εγκλείστα, πρέπει να πραγματοποιηθεί απομόνωση και καθαρισμός τους. Η διαδικασία καθαρισμού είναι η εξής:

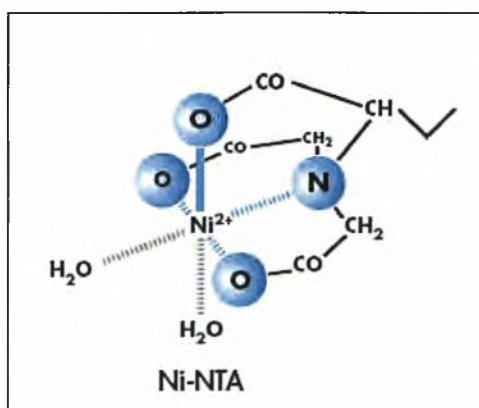
- ❖ Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε διάλυμα PBS που περιέχει 1mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), 1 mM PMSF και 0.2 mg/ml λυσοζύμη

- ❖ Το αιώρημα αναδεύεται για 45 λεπτά στους 4°C
- ❖ Προστίθεται Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 1% v/v και ακολουθεί πεντάλεπτη ανάδευση στους 4°C
- ❖ Πραγματοποιείται κατεργασία των κυττάρων με υπερήχους, 4 φορές από 30 δευτερόλεπτα, προκειμένου να σπάσουν
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 14000 rpm στους 4°C
- ❖ Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε ίσο με τον αρχικό όγκο διαλύματος που αποτελείται από 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% δεοξυχολικό νάτριο και 0.2 mg/ml λυσοζύμη
- ❖ Το αιώρημα αναδεύεται για 30 λεπτά στους 4°C
- ❖ Ακολουθεί δεύτερη κατεργασία των κυττάρων με υπερήχους (4φορές από 30 δευτερόλεπτα)
- ❖ Προστίθεται MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 8 mM και DNase I σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml
- ❖ Η ανάδευση συνεχίζεται για 1 – 2 ώρες στους 4°C
- ❖ **Κατόπιν** ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 14000 rpm στους 4°C
- ❖ Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε ίδιο όγκο διαλύματος 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA και 1% Nonidet P-40 (NP-40)
- ❖ Το αιώρημα αναδεύεται για 15 λεπτά στους 4°C
- ❖ Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 14000 rpm στους 4°C
- ❖ Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται εκ νέου σε ίσο όγκο διαλύματος 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl και 0.5 mM DTT
- ❖ Το αιώρημα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 14000 rpm στους 4°C
- ❖ Τα δύο τελευταία βήματα επαναλαμβάνονται και το τελικό ίζημα αντιπροσωπεύει τα καθαρισμένα βακτηριακά έγκλειστα

B.2.11. Χρωματογραφικός καθαρισμός του SDF-1α με στήλη αγκιστείας Ni^{2+} - NTA αгарόξης

Η χρωματογραφία συγγενείας είναι μία εκλεκτική μέθοδος καθαρισμού πρωτεϊνών, που στηρίζεται στην ικανότητα των πρωτεϊνικών μορίων να συνδέονται με κατάλληλα επιλεγμένο πρόσδεμα (ligand). Ως πρόσδεμα, ορίζεται κάθε μόριο που είναι καθηλωμένο σε κάποιο αδρανές υλικό και εμφανίζει μεγάλη συγγένεια με πρωτεΐνες. Τα πρωτεϊνικά μόρια που αναγνωρίζουν το πρόσδεμα προσδένονται σε αυτόν, ενώ τα υπόλοιπα περνούν αδέσμευτα μέσα από τη στήλη και εκκλύονται άμεσα. Η εκλεκτική παραλαβή των συνδεδεμένων στη στήλη μορίων επιτυγχάνεται είτε με την προσθήκη στο διάλυμα έκλουσης του ίδιου του συνδέτη ή ανάλογου του, είτε με αλλαγή του pH και της ιονικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης.

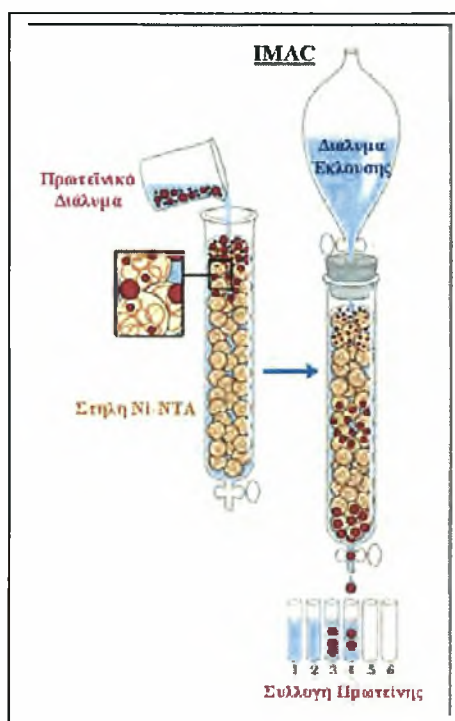
Ο καθαρισμός με τη χρωματογραφική μέθοδο IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1975, ενώ το πρώτο χηλικό πρόσδεμα ήταν το ιμινο-διοξικό οξύ (IDA, ~~imin~~iminodiacetic acid) που συνδεόταν με ιόντα μετάλλων Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} . Σήμερα, το IDA έχει αντικατασταθεί από το νιτριλο-τριοξικό οξύ (NTA, nitrilo-triacetic acid), το οποίο είναι ένα τετραδοτικό χηλικό πρόσδεμα που χρησιμοποιεί τις τέσσερις από τις έξι μονάδες συναρμογής του νικελίου για τη σύνδεσή του με αυτό και τις υπόλοιπες δύο για τη σύνδεσή του με την ουρά των 6 ή 10 ιστιδινών της πρωτεΐνης.



Εικόνα 11. Ni-NTA Στήλη

QIAexpress – Detection and Assay Handbook: March 2001

Η έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τη στήλη Ni-NTA γίνεται με τη χρήση αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου, το οποίο αποτελεί μέρος της δομής της ιστοδίνης και λειτουργεί ανταγωνιστικά προς το Ni-NTA. Η χρήση μικρής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου στις πλύσεις βοηθά στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν συνδεθεί μη-ειδικά στην στήλη της χρωματογραφίας.



Εικόνα 12. Καθαρισμός πρωτεϊνών με Στήλη Χρωματογραφίας Συγγενείας (IMAC)

Διαφοροποιημένη Αναπαραγωγή από course.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads1

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης μπορεί να γίνει υπό μετουσιωτικές (παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης, ουρίας) ή μη συνθήκες. Στην παρούσα εργασία ο καθαρισμός του SDF-1 έγινε υπό μετουσιωτικές συνθήκες και αναλυτικά τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

❖ Απομόνωση και καθαρισμός των βακτηριακών εγκλείστων σύμφωνα με το αναφερόμενο πρωτόκολλο

- ❖ Επαναιώρηση των καθαρών εγκλείστων σε Solubilization Buffer (pH 8.0): 6 M υδροχλωρική γουανιδίνη, 10 mM Tris-HCl, 100 mM Na₂HPO₄, 5 mM ιμιδαζόλιο, 0.1 mM DTT (3-4 ml / gr ιζήματος βακτηρίων)
- ❖ Ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm (R.T. / κεφαλή SS34) για 20 λεπτά
- ❖ Έπειτα το υπερκείμενο αναμειγνύεται με Ni-NTA αгарόζη (50% αιώρημα), η οποία προηγουμένως έχει εξισορροπηθεί (δύο φορές) με ίσο όγκο στήλης Solubilization Buffer
- ❖ Ανάδευση για 30 λεπτά
- ❖ Το μίγμα μεταφέρεται σε στήλη (Econo-column, Biorad) και αφήνεται να πακεταριστεί. Αφού πακεταριστεί σωστά, αρχίζει η ροή
- ❖ Το δείγμα επανατοποθετείται στη στήλη και η ροή συνεχίζεται
- ❖ Ακολουθεί πλύση της στήλης με 3 όγκους στήλης Solubilization Buffer
- ❖ Στη συνέχεια η στήλη πλένεται με 10 όγκους στήλης Wash I Buffer (pH 8.0): 8 M ουρία, 10 mM Tris-HCl, 100 mM Na₂HPO₄, 5 mM ιμιδαζόλιο, 0.1 mM DTT
- ❖ Έπειτα πραγματοποιείται πλύση της στήλης με 10 όγκους στήλης Wash II Buffer (pH 8.0): 8M ουρία, 10mM Tris-HCl, 100mM Na₂HPO₄, 30mM ιμιδαζόλιο, 0.1mM DTT
- ❖ Ακολουθεί η έκλουση της πρωτεΐνης με Elution Buffer (pH 6.9): 8 M ουρία, 10 mM Tris-HCl, 100 mM Na₂HPO₄, 500 mM ιμιδαζόλιο, 0.1 mM DTT
- ❖ Τα κλάσματα συλλέγονται (0.5 - 1 ml / κλάσμα) και πραγματοποιείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της υπάρχουσας πρωτεΐνης κατά Bradford
- ❖ Πραγματοποιείται διαπίδυση των δειγμάτων σε διάλυμα διαπίδυσης 1x PBS, για 16-18 ώρες. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, το διάλυμα διαπίδυσης χωρίστηκε στα δύο, και στη μισή ποσότητα προστέθηκε το οξειδοαναγωγικό σύστημα της γλουταθειόνης (0.5 mM GSSG / 1 mM GSH), ενώ στην υπόλοιπη μισή ποσότητα προστέθηκε 0.1 mM DTT
- ❖ Αλλαγή των διαλυμάτων διαπίδυσης με φρέσκα, της ίδιας σύστασης με τα προηγούμενα, στα οποία όμως έχει προστεθεί και 10 % γλυκερόλη. Η διαπίδυση συνεχίζεται για 4-5 ακόμη ώρες, προκειμένου να εξασφαλισθεί η απομάκρυνση όλης της ποσότητας της ουρίας

❖ Τελικά, πραγματοποιείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

B.2.12. Προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford

Η μέθοδος προσδιορισμού των πρωτεϊνών κατά Bradford στηρίζεται στην ποσοτικοποίηση της δέσμευσης της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος και τη σύγκριση αυτής της δέσμευσης με τις τιμές μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις μιας πρωτεΐνης αναφοράς, όπως της αλβουμίνης βόειου ορού (BSA). Όταν η όξινη αυτή χρωστική δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη, τότε το μέγιστο της απορρόφησης μετατοπίζεται από τα 465 nm στα 595 nm. Η χρωστική δεσμεύεται σε βασικά και αρωματικά αμινοξέα της πρωτεΐνης και ιδιαίτερα στην αργινίνη. Με τη μέθοδο αυτή **μπορούν να ποσοτικοποιηθούν** διαλύματα που περιέχουν από 1 – 20 µg πρωτεΐνης.

Αναλυτικά, από κάθε δείγμα μεταφέρεται μια μικρή **ποσότητα** της πρωτεΐνης σε ένα σωληνάριο και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα **800µl** με απεσταγμένο νερό. Κατόπιν προστίθενται 200 µl του Protein Assay Reagent Concentrate (Bio-Rad), που περιέχει τη χρωστική, φωσφορικό οξύ και μεθανόλη, και το μίγμα αναδεύεται. Ακολουθεί παραμονή του μίγματος σε θερμοκρασία **δωματίου** για 3-20 λεπτά και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με σύγκριση της παραπάνω τιμής με μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

B.2.13. Ηλεκτροφόρηση

B.2.13.1. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης επιτρέπει τον διαχωρισμό των τμημάτων αυτών ανάλογα με το μέγεθός τους. Πραγματοποιείται υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA εξαρτάται από το

μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, όπως επίσης και από τη συγκέντρωση της πηκτής, την εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού και τη σύσταση του ηλεκτροφορητικού ρυθμιστικού διαλύματος. Ο εντοπισμός των ζωνών του DNA στην πηκτή επιτυγχάνεται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου τόσο στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, όσο και στο διάλυμα της πηκτής. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια φθορίζουσα χρωστική η οποία συνδέεται στο δίκλωνο μόριο DNA, απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία στα 302 και 366 nm και επανεκπέμπει την ενέργεια στα 590 nm, στην περιοχή του κόκκινου ορατού φάσματος.

Η πηκτή αгарόζης παρασκευάζεται ως εξής:

Κατάλληλη ποσότητα αгарόζης προστίθεται υπό συνεχή ανάδευση σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5x (0.5 mM Na₂EDTA, 44.5 mM βορικό οξύ, 44.5 mM Tris, pH 8.0) το οποίο περιέχει 0.5 µg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Το αιώρημα θερμαίνεται στους 100° C μέχρις ότου πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της αгарόζης. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και όταν η θερμοκρασία του γίνει περίπου 55° C, αποχύνεται σε ειδικό καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης, στο οποίο προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί ειδικά χτενάκια προκειμένου να σχηματισθούν κατάλληλες θέσεις επιστοίβαξης των δειγμάτων. Το διάλυμα αφήνεται για περίπου 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματισθεί η πηκτή και στη συνέχεια αφαιρούνται τα χτενάκια και προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0.5x TBE με 0.5 µg/ml EtBr). Τα δείγματα του DNA πριν ηλεκτροφορηθούν αναμιγνύονται με ορισμένη ποσότητα διαλύματος επιστοίβαξης (5% v/v γλυκερόλη, 0.01% w/v κυανού του ξυλενίου, 0.01% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 60 V και στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 90 V.

Στην περίπτωση που απαιτείται εκχύλιση και καθαρισμός τμημάτων DNA μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού ή υψηλές συγκεντρώσεις πηκτής, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως (65° C). Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι η ίδια με τη διαφορά ότι η δημιουργία της πηκτής πραγματοποιείται στους 4° C. Όταν τα διαχωριζόμενα τμήματα DNA πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για κλωνοποίηση, αποκόπτονται από την πηκτή με νυστέρι, μεταφέρονται σε σωληνάρια Eppendorf και αποθηκεύονται στους -20° C,

εκτός και αν χρησιμοποιηθούν άμεσα, αφού πρώτα γίνει η τήξη τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65° C.

B.2.13.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου μέσα από τους πόρους μιας πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή σχηματίζεται με τον συμπολιμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N-μεθυλενοδιαακρυλαμιδίου (bis-ακρυλαμίδιο / $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$). Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός πορώδους πλέγματος, όπου το bis-ακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των γεφυρών μεταξύ των πολυμερών του ακρυλαμιδίου. Ως καταλύτης της έναρξης της αντίδρασης του πολυμερισμού χρησιμοποιείται το υπερθειικό αμμώνιο $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$, το οποίο είναι δότης ελευθέρων ριζών, ενώ ως πολλαπλασιαστής των ελευθέρων αυτών ριζών χρησιμοποιείται η N,N,N,N-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του μονομερούς ακρυλαμιδίου που χρησιμοποιείται.

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει παρουσία ή απουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS ή ουρία), να είναι μονοδιάστατη ή δισδιάστατη, συνεχής ή ασυνεχής. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η ασυνεχής, μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία SDS (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου), επιτυγχάνει το διαχωρισμό αυτών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και τις αποδιατάσσει. Ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες δίνουν γραμμικά μόρια τα οποία φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο, ανάλογο της μάζας τους. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού οι αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες κινούνται μέσα από τους πόρους της πηκτής προς την άνοδο.

Κατά την ασυνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο πηκτές: η πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), η οποία είναι υπευθυνα για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών, και η πηκτή διαχωρισμού (separating gel), η οποία ευθύνεται για τον

διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες. Το εύρος διαχωρισμού εξαρτάται από την περιεκτικότητα της πηκτής σε ακρυλαμίδιο.

Συγκέντρωση Πηκτής	Πρωτεΐνες (kDa)
6%	60 – 200
8%	50 – 150
10%	25 – 100
12%	15 – 80
15%	<15

Πίνακας 3. Διαχωριστική Ικανότητα Πηκτών Ακρυλαμιδίου

Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις:

Πηκτή διαχωρισμού (50ml)	15%
Ακρυλαμίδιο (30%)	25 ml
Bis-ακρυλαμίδιο (2%)	12 ml
5x Running gel buffer (Tris-HCl pH 8.9)	10 ml
SDS 10% w/v	0.5 ml
APS (30%)	200 µl
TEMED	25 µl
H ₂ O	2.5 ml

Πίνακας 4. Σύσταση Πηκτής Διαχωρισμού

Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή για 45-60 λεπτά. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβαξης, η οποία αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 λεπτά. Η περιεκτικότητά της σε ακρυλαμίδιο είναι ίση με 4% και η σύστασή της η εξής:

Πηκτή επιστοίβαξης (30 ml)	4%
Ακρυλαμίδιο (30%)	4 ml
Bis-ακρυλαμίδιο (2%)	2 ml
5x Stacking gel buffer (Tris-HCl pH 6.8)	6 ml
SDS 10% w/v	0.3 ml
APS (30%)	300 μ l
TEMED	30 μ l
H ₂ O	17.4 ml

Πίνακας 5. Σύσταση Πηκτής Επιστοίβαξης

Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα SDS-PAGE (25 mM Tris-HCl, 0.192M γλυκίνη και 0.1% w/v SDS, **pH 8.3**). Στα δείγματα που ηλεκτροφορούνται προστίθεται διάλυμα επιστοίβαξης **SDS** σε τελική συγκέντρωση 1x, το οποίο περιέχει 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, **2% w/v SDS**, 10% γλυκερόλη, 0.05% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης και 2% **v/v** β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα δείγματα πριν την επιστοίβαξή τους βράζονται για 5-7 λεπτά, για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών, και ακολούθως «φορτώνονται» στις θέσεις εισαγωγής στην πηκτή επιστοίβαξης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά σε σταθερή τάση 60 V, μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, και στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 120 V.

B.2.13.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές Tricine

Το Tricine [N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine] είναι μια οργανική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται για την παρασκευή ρυθμιστικών ηλεκτροφορητικών διαλυμάτων.

Το σύστημα Tricine-SDS-PAGE (Schaegger and vonJagow, 1987) αποτελεί μια μέθοδο ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, υπό αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS. Πρόκειται για μια παραλλαγή του συστήματος Tris-Glycine-SDS-PAGE και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πεπτιδίων και πρωτεϊνών με μικρό μοριακό βάρος, αν και το εύρος της ανάλυσης κυμαίνεται από 2-100 kDa. Η βέλτιστη απόδοση του συστήματος παρατηρείται για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μεταξύ 5 και 20 kDa. Στο σύστημα αυτό, το Tricine αντικαθιστά την γλυκίνη στην πηκτή διαχωρισμού, και καθώς έχει μικρότερο αρνητικό φορτίο από αυτή, μετακινείται ταχύτερα στην πηκτή. Επιπλέον, σε σχέση με τη γλυκίνη, η υψηλή ιονική ισχύς του tricine, προκαλεί μεγαλύτερη μετακίνηση ιόντων και μικρότερη μετακίνηση μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τα μικρά πεπτίδια και οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες να αναλύονται καλύτερα σε πηκτές με χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο.

Οι πηκτές διαχωρισμού και επιστοίβαξης πολυμερίζονται ταυτόχρονα σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης. Αρχικά στην συσκευή τοποθετείται το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού και αμέσως τοποθετείται από πάνω το διάλυμα της πηκτής επιστοίβαξης πολύ προσεκτικά ώστε να μην αναμιχθούν τα δύο διαλύματα. Αυτό αποτρέπεται και από την παρουσία γλυκερόλης στο διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού, η οποία το καθιστά βαρύτερο. Τέλος στην πηκτή επιστοίβαξης τοποθετούνται ειδικά πλαστικά χτενάκια, ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων, τα οποία αφαιρούνται μετά τον πολυμερισμό της πηκτής.

Η σύσταση των δύο πηκτών είναι η εξής:

	Πηκτή Επιστοίβαξης (30 ml)	Πηκτή Διαχωρισμού (60 ml)		
% T	4%	10%	12.5%	16.5%
% C	3%	3%	3%	3%
Ακρυλαμίδιο (30%)	7.76 ml	19.4 ml	24.25 ml	9.6 gr
Bis-ακρυλαμίδιο (2%)	3.6 ml	9 ml	11.25 ml	0.292 gr
Γλυκερόλη	-	8 gr	8 gr	8 gr
Gel Buffer	7.4 ml	20 ml	20 ml	20 ml
H ₂ O	Up to 30 ml	Up to 60 ml	Up to 60 ml	Up to 60 ml
APS (30%)	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
TEMED	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl

Πίνακας 6. Σύσταση Πηκτών Tricine

Σε αυτή τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται 3 ρυθμιστικά διαλύματα:

- ❖ Το ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής (Gel Buffer), με σύσταση 3M Tris-HCl pH 8.45 και 0.3% SDS
- ❖ Το ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου, με σύσταση 0.1M Tris pH 8.25, 0.1M Tricine και 0.1% SDS
- ❖ Το ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου, με σύσταση 0.2M Tris-HCl pH 8.9

Στα δείγματα, πριν την επιστοίβαξή τους, προστίθεται διάλυμα επιστοίβαξης SDS σε τελική συγκέντρωση 1x, το οποίο περιέχει 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v SDS, 10% γλυκερόλη, 0.05% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης και 2% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, βράζονται για 5-7 λεπτά, για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών, και ακολούθως «φορτώνονται» στις θέσεις εισαγωγής στην πηκτή επιστοίβαξης. Η ηλεκτροφόρηση αρχικά ξεκινά στα 30 V μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, και στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 110 V.

B.2.14. Χρώση πηκτής ακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue (CBB R-250)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου κυανού χρώματος μεταξύ των πρωτεϊνών και της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0.1% w/v χρωστικής, 40% v/v μεθανόλης και 10% v/v οξικού οξέος, όπου ανακινείται για 60 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα χρώσης και η πηκτή αποχρωματίζεται υπό ανάδευση σε διάλυμα που περιέχει 40% v/v μεθανόλη και 10% v/v οξικό οξύ. Με τον αποχρωματισμό παραμένουν χρωματισμένες μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες και τελικά η πηκτή αφήνεται σε διάλυμα το οποίο περιέχει 10% v/v μεθανόλη και 5% v/v οξικό οξύ, όπου μπορεί να συντηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

B.2.15. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης – Ανοσοαποτύπωμα Western (Western Blotting)

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού στις πρωτεΐνες της πηκτής. Οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν αρνητικό φορτίο λόγω της σύνδεσής τους με το SDS, υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την άνοδο. Έτσι, μεταφέρονται διαμέσου της πηκτής και καθλώνονται στο πλέγμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, με τη βοήθεια υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των καθηλωμένων πρωτεϊνών με τη χρήση κατάλληλων πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων.

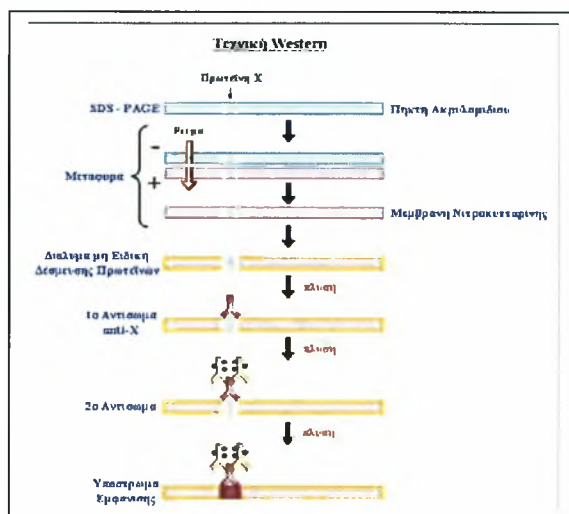
Αρχικά μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ίδιων διαστάσεων με την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, υγραίνεται σε απιονισμένο H₂O (5-7 λεπτά) και στη συνέχεια εξισορροπείται στο διάλυμα μεταφοράς (25 mM Tris, 0.192 M γλυκίνη και 20% v/v μεθανόλη) για 10 λεπτά. Συγχρόνως, στο ίδιο διάλυμα μεταφοράς, εμβαπτίζεται και η πηκτή (για όχι περισσότερο από 20 λεπτά), καθώς επίσης και 4 χαρτιά τύπου Whatmann 3MM. Στη συνέχεια συναρμολογείται η διάταξη της μεταφοράς που

αποτελείται κατά σειρά από: 2 υγρά χαρτιά Whatmann 3MM, την πηκτική πολυακρυλαμίδιου, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και άλλα 2 υγρά χαρτιά Whatmann 3MM. Η διάταξη αυτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Συσκευή Western Blot: TE22, εταιρία Pharmacia Biotech.), με τέτοιο τρόπο ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου. Η μεταφορά γίνεται στα 36 V για 2 ώρες και 30 λεπτά.

Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη επώάζεται σε διάλυμα μη-ειδικής δέσμησης πρωτεϊνών (Blocking solution: 1x PBS, 0.1% Tween-20 και 5% w/v σκόνη άπαχου γάλακτος) είτε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου είτε ολονύκτια στους 4° C. Κατόπιν, η μεμβράνη επώάζεται με το πρωτεύον αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την υπό μελέτη καθηλωμένη πρωτεΐνη, και το οποίο προστίθεται σε κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα μη-ειδικής δέσμησης πρωτεϊνών (1x PBS, 0.1% v/v Tween-20, 0.5% w/v σκόνη άπαχου γάλακτος), για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα 1x PBST (1x PBS με 0.1% v/v Tween-20). Έπειτα γίνεται επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα, αναγνωρίζει και δεσμεύει τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου αντισώματος, και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση από αγριοράπανο (HRP). Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές με διάλυμα PBST και δύο φορές με διάλυμα PBS, από 5 λεπτά η κάθε πλύση. Προκειμένου να γίνει η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που είναι δεσμευμένες με το πρωτεύον αντίσωμα ακολουθεί η εξής διαδικασία: Παρασκευάζεται ένα διάλυμα 0.05% w/v 3,3'-διαμινοβενζιδίνης (DAB) σε PBS, το οποίο δίνει χαρακτηριστική χρωμο-αντίδραση που αντιστοιχεί στη ζώνη της πρωτεΐνης-αντιγόνου που μελετάται. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται 2% v/v ενός διαλύματος 0.05% H₂O₂. Ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά και στη συνέχεια το διάλυμα διηθείται μέσω ενός πτυχωτού διηθητικού ηθμού. Το διάλυμα προστίθεται στη μεμβράνη και αναδεύεται ήπια μέχρι την εμφάνιση των ζωνών. Η εμφάνιση των ζωνών οφείλεται στο γεγονός ότι η υπεροξειδάση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το H₂O₂ οξειδώνει την DAB και τη μετατρέπει σε αδιάλυτο καφέ ίζημα, το οποίο επικάθεται στις περιοχές που είναι δεσμευμένο το δεύτερο αντίσωμα. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η μεμβράνη

ξεπλένεται σε απεσταγμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει ανάμεσα σε διηθητικά χαρτιά.

Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών, εκτός από τη χρήση του DAB, μπορεί να γίνει και με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.



Εικόνα 13. Ανάλυση Πρωτεϊνών κατά Western

Διαφοροποιημένη Αναπαραγωγή από www.peprotech.com/uploadedimages/Figure%20III%20-%201

2.16. Ανοσοποίηση κουνελιού

Προκειμένου να παραχθούν πολυκλωνικά αντισώματα ενάντια στην υπό μελέτη πρωτεΐνη, έγινε ανοσοποίηση ενός κουνελιού, ηλικίας 4 εβδομάδων, με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη SDF-1α.

Β.2.16.1. Συλλογή προάνοσου ορού

Πριν τη χορήγηση του αντιγόνου, πραγματοποιήθηκε συλλογή ορού από το κουνέλι, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας στη διαδικασία ελέγχου (ανοσοαποτύπωμα Western Blot) των πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη συλλογή του ορού είναι η εξής:

- ❖ Δημιουργείται μια τομή σε φλέβα της περιοχής του αυτιού με αποστειρωμένο νυστέρι
- ❖ Συλλέγονται 3.5 ml αίματος. Για την αποφυγή της πήξης στο σημείο της τομής γίνεται τοπική επάλειψη με βαζελίνη
- ❖ Το αίμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4-5 ώρες προκειμένου να πήξει
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 6000 rpm
- ❖ Ο ορός χωρίζεται σε σωληνάρια erpendorf
- ❖ Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 6 λεπτά στις 10000 rpm
- ❖ Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο erpendorf όπου μετράται ο ακριβής όγκος τους και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 10% v/v
- ❖ Τέλος ο ορός χωρίζεται σε 2 ποσότητες και διατηρείται στους -20° C

B.2.16.2. Ανοσοποίηση κουνελιού

Τρεις ημέρες μετά την συλλογή του προάνοσου ορού ξεκινά η ανοσοποίηση του κουνελιού. Για την ανοσοποίηση χρησιμοποιείται το ανοσοενισχυτικό του Freund, ένα από τα πιο ισχυρά ανοσοενισχυτικά για τη διέγερση έντονων και παρατεταμένων ανοσοαποκρίσεων. Όταν το ανοσοενισχυτικό περιέχει νεκρά κύτταρα του *Mycobacterium tuberculosis* καλείται πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (complete Freund's adjuvant), ενώ όταν δεν περιέχει βακτήρια καλείται μη-πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (incomplete Freund's adjuvant). Συγκεκριμένα, για την πρώτη δόση, χρησιμοποιούνται 200 µg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης τα οποία προστίθενται σε 1 ml πλήρους ανοσοενισχυτικού Freund. Το μίγμα γαλακτωματοποιείται με πολλαπλά περάσματα από σύριγγα με βελόνα και τελικά το γαλάκτωμα χορηγείται υποδορίως σε πολλαπλά σημεία στο κουνέλι. Ακολουθεί μια σειρά από επαναλαμβανόμενες μικρότερες δόσεις, οι οποίες καλούνται «αναμνηστικές δόσεις», οι οποίες στοχεύουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του κουνελιού και στην αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων στον ορό. Για τις «αναμνηστικές δόσεις» χρησιμοποιούνται 100 µg πρωτεΐνης, στα οποία προστίθεται 1 ml μη-πλήρους ανοσοενισχυτικού Freund, γαλακτωματοποιούνται και χορηγούνται με τον ίδιο τρόπο υποδορίως στο κουνέλι.

Οι «αναμνηστικές δόσεις» γίνονται τη 2^η, 4^η, 6^η, 8^η και 10^η εβδομάδα από την πρώτη δόση ανοσοποίησης, ενώ η συλλογή αντιορού γίνεται την 7^η, 9^η και 11^η εβδομάδα.

B.2.16.3. Συλλογή αντιορού

Την 7^η, 9^η και 11^η εβδομάδα από την πρώτη δόση ανοσοποίησης γίνεται συλλογή αίματος, το οποίο περιέχει τα πολυκλωνικά αντισώματα που παρήχθησαν εναντίον της αντιγονικής πρωτεΐνης. Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή της συλλογής του προάνοσου ορού και έχει ως εξής:

- ❖ Δημιουργείται μια τομή σε φλέβα του αυτιού του κουνελιού, αφού πρώτα αποστειρωθεί καλά, με νυστέρι
- ❖ Συλλέγονται 40-50 ml αίματος και αφήνονται να πήξουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 4 ώρες
- ❖ Το αίμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 4000 rpm
- ❖ Ο ορός μεταφέρεται σε σωληνάρια errendorf και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 10000 rpm
- ❖ Τα υπερκείμενα συλλέγονται σε νέο σωληνάριο όπου μετράται ο ακριβής όγκος τους και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 10% v/v
- ❖ Ο ορός τελικά μοιράζεται σε 8 σωληνάρια των 1.8 ml, τα οποία αποθηκεύονται στους -80° C και σε 2 σωληνάρια των 15 ml, τα οποία αποθηκεύονται στους -20° C

B.2.16.4. Έλεγχος του τίτλου των αντιορών

Οι συλλεγμένοι αντιοροί ελέγχονται με την τεχνική Western προκειμένου να εξακριβωθεί η παρουσία και ο τίτλος των επιθυμητών αντισωμάτων. Ο έλεγχος γίνεται με την χρήση φύλλων νιτροκυταρίνης στα οποία έχει προηγουμένως ηλεκτροφορηθεί επιλεγμένη ποσότητα πρωτεϊνών-αντιγόνων. Ως πρωτεύον αντίσωμα χρησιμοποιείται ο συλλεγμένος αντιορός σε διάφορες αραιώσεις, ενώ ως δευτερεύον αντίσωμα χρησιμοποιείται κατάλληλο αντίσωμα ειδικό ως προς τις ανοσοσφαιρίνες του κουνελιού. Ο προάνοσος αντιορός χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή της χημειοκίνης SDF-1α με χρήση βακτηριακών φορέων έκφρασης

Γ.1.1. Ενίσχυση του cDNA της ανθρώπινης χημειοκίνης SDF-1α

Το πρώτο βήμα της όλης πειραματικής εργασίας εστιάστηκε στην ενίσχυση του cDNA τμήματος που κωδικοποιεί τον ανθρώπινο ώριμο SDF-1α, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές που υβριδίζονταν με την επιλεγμένη αλληλουχία-στόχο και επέτρεπαν τον πολλαπλασιασμό της περιοχής αυτής. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε σύμφωνα με τους εξής κοινά αποδεκτούς κανόνες:

- Το μήκος **ενός εκκινητή** πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 17-28 νουκλεοτιδίων
- Το ποσοστό των βάσεων GC στην αλληλουχία του εκκινητή θα πρέπει να είναι ίσο με το 50-60% του συνολικού
- Τα 3' άκρα των εκκινητών πρέπει να τελειώνουν σε G, C ή GC έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η μη αποκόλληση τους από τις περιοχές επικάθισης στην περιοχή του ενδιαφέροντος
- Τα T_m (melting temperatures) των δύο εκκινητών θα πρέπει να είναι σε σχετικά παρόμοιες θερμοκρασίες και να εντοπίζονται στο εύρος των 55-80° C
- Ο σχηματισμός των διμερών ανάμεσα στους εκκινητές (primer dimers), αλλά και των δευτεροταγών δομών τύπου φουρκέτας στον ίδιο τον εκκινητή, πρέπει να αποφεύγεται
- Η επανάληψη άνω των τριών G ή C στο 3' άκρο πρέπει να αποφεύγεται, ώστε να εξασφαλίζεται η αποφυγή μη σωστής επικάθισης των εκκινητών σε άλλες νουκλεοτιδικές περιοχές που είναι πλούσιες σε γουανίνες ή κυτοσίνες (mispriming)
- Οι εκκινητές μετά το σχεδιασμό τους θα πρέπει να ελέγχονται με βιοπληροφορική ανάλυση για την εξασφάλιση της εξειδίκευσής τους προς τη συγκεκριμένη περιοχή για την οποία σχεδιάστηκαν (ανάλυση κατά BLAST)

Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές (FNd-SDF-1α και RX-SDF-1α), οι οποίοι υβριδίζονταν στην κατάλληλη περιοχή του cDNA του SDF-1α. Επιπλέον, οι εκκινητές έφεραν θέσεις αναγνώρισης για τις ενδονουκλεάσες περιορισμού Nde I (5' άκρο) και Xho I (3' άκρο), έτσι ώστε κατά την αντίδραση της PCR να εισάγονται στα προϊόντα οι αντίστοιχες αλληλουχίες και να καθίσταται δυνατή η περαιτέρω κλωνοποίηση τους στους βακτηριακούς πλασμιδιακούς φορείς.

Ως υποστρώματα για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν διάφορα cDNA από πληθυσμούς ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, τα οποία ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο. Οι αρχικές προσπάθειες ενίσχυσης της κωδικής περιοχής του ώριμου SDF-1α (αα 22-89) με PCR δεν απέδωσαν προϊόν, είτε λόγω επικάθισης των primers σε λάθος περιοχή είτε λόγω σχηματισμού διμερών μεταξύ αυτών. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να ακολουθηθεί η μέθοδος της nested PCR, δηλαδή να παραχθεί μια ποσότητα προϊόντος PCR με τη χρήση εξωτερικών εκκινητών, το οποίο και θα χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα για μια δεύτερη PCR, με διαφορετικό ζευγάρι εκκινητών, που αναγνωρίζουν αλληλουχίες στο εσωτερικό του πρώτου PCR προϊόντος, η οποία και θα δώσει το τελικό προϊόν. Με τον τρόπο αυτό θα ελαχιστοποιηθεί η δημιουργία μη-ειδικών προϊόντων. Το πρώτο ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκαν από τη βιβλιογραφία (Arai, J., et al., Eur. J. Haematol., 2000. 64: 323-333 ^[37]), ενώ το δεύτερο ζεύγος ήταν οι αρχικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο (FNd-SDF-1α και RX-SDF-1α). Παρακάτω φαίνονται οι αναφερόμενοι εκκινητές:

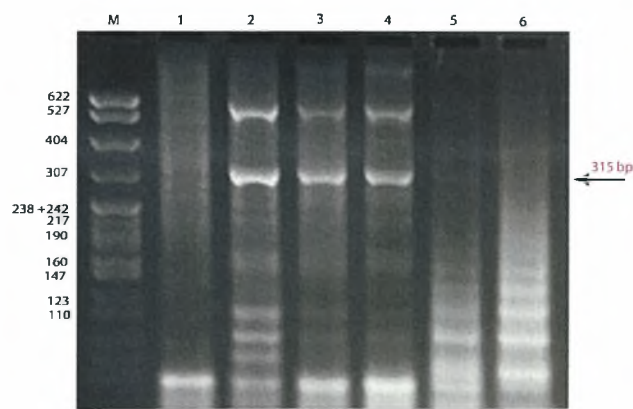
Εκκινητής	Αλληλουχία	Ε.Π.	T _m
SDF-1aL-S	5'-GCCATGAACGCCAAGGTCGTGGT-3'	-	74
SDF-1aL-A	5'-CCTCGAGTGGGTCTAGCGGAAAG-3'	-	74
FNd-SDF1a	5'-CC CATATG AAGCCCGTCAGCCTGAGCTAC-3'	Nde I	78
RX-SDF1a	5'-CG CTCGAG CTTGTTTAAAGCTTTCTCCAGG-3'	Xho I	70

Πίνακας 7. Εκκινητές PCR

Ως υποστρώματα, για την πρώτη αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκαν 5 cDNA από διαφορετικούς πληθυσμούς ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι SDF-1aL-S και SDF-1aL-A. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή της πρώτης PCR αντίδρασης ήταν οι εξής:

Θερμοκρασία Αποδιάταξης: 94° C	Χρόνος Αποδιάταξης: 1 ΛΕΠΤΟ
Θερμοκρασία Υβριδισμού: 60° C	Χρόνος Υβριδισμού: 1 ΛΕΠΤΟ
Θερμοκρασία Πολυμερισμού: 72° C	Χρόνος Πολυμερισμού: 1 ΛΕΠΤΟ
Αριθμός κύκλων: 35	

Τα προϊόντα από την πρώτη αντίδραση PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης χαμηλού σημείου τήξεως (3%), προκειμένου να ελεγχθεί το μοριακό μέγεθός τους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αναπαριστώνται στην παρακάτω εικόνα, όπου φαίνονται τα προϊόντα με το σωστό μοριακό μέγεθος των 315 bp.



Εικόνα 14. Ενίσχυση του cDNA του SDF-1α

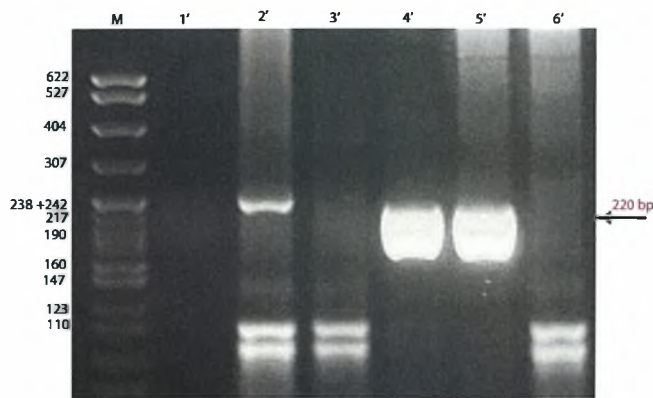
[M: Μάρτυρες Μεγέθους DNA – πλασμίδιο pBR322 που υπέστη πέψη με MspI, 1: αντίδραση PCR στην οποία δεν έχει προστεθεί cDNA, 2 – 6: προϊόντα PCR από 5 διαφορετικά cDNA, 15μl / δείγμα]

Στη συνέχεια, μέρος των παραπάνω προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την διεξαγωγή της δεύτερης nested αντίδρασης PCR, με εκκινητές τους FNd-SDF-1a και RX-SDF-1a, οι οποίοι ενίσχυσαν μόνο την περιοχή

του cDNA που κωδικοποιεί τον ώριμο SDF-1α (αα 22-89), αλλά και εισήγαγαν τις κατάλληλες θέσεις περιορισμού στα τελικά προϊόντα. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η δεύτερη αντίδραση ήταν οι εξής:

Θερμοκρασία Αποδιάταξης:	94° C	Χρόνος Αποδιάταξης:	1 ΛΕΠΤΟ
Θερμοκρασία Υβριδισμού:	58° C	Χρόνος Υβριδισμού:	1 ΛΕΠΤΟ
Θερμοκρασία Πολυμερισμού:	72° C	Χρόνος Πολυμερισμού:	1 ΛΕΠΤΟ
Αριθμός κύκλων: 30			

Τα προϊόντα που ενισχύθηκαν από την δεύτερη PCR αντίδραση, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης χαμηλού σημείου τήξεως (3%), προκειμένου να ελεγχθεί το μοριακό τους μέγεθος και η καθαρότητα τους. Παρακάτω (εικόνα 15) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όπου φαίνονται τα 3 θετικά προϊόντα με το σωστό μοριακό βάρος (προϊόντα 2', 4' και 5'). Συγκεκριμένα, το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν στα 220 bp. Το μέγεθος του τελικού προϊόντος αναμενόταν στα 220 bp, διότι το συγκεκριμένο κομμάτι περιλαμβάνει τόσο την κωδική αλληλουχία της ώριμης χημειοκίνης SDF-1α (204 bp) όσο και τις αλληλουχίες αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού.



Εικόνα 15. Ενίσχυση των Προϊόντων PCR με nested PCR

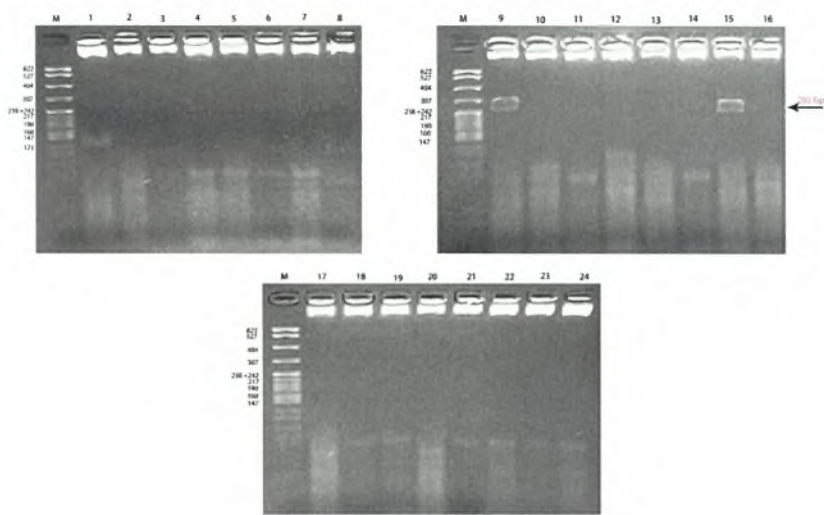
[M: Μάρτυρες Μεγέθους DNA – πλασμίδιο pBR322 που υπέστη πέψη με MspI, 1': αντίδραση στην οποία δεν έχει προστεθεί προϊόν PCR, 2' – 6': προϊόντα ενίσχυσης με template τα προϊόντα της πρώτης PCR, 15μl / δείγμα]

Γ.1.2. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR στο βακτηριακό φορέα pZero2.1

Επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR στον πλασμιδιακό φορέα pZero2.1. Συγκεκριμένα, τα τρία προϊόντα της PCR με το σωστό μοριακό μέγεθος, κλωνοποιήθηκαν σε μια τροποποίηση του πλασμιδιακού φορέα pZero2.1, τον pZeTA. Τα πλασμίδια pZero 2.1 είχαν προηγουμένως υποστεί κατεργασία δύο σταδίων (αυτού της πέψης με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV και αυτού της προσθήκη άκρων T), προκειμένου να καταστούν δεκτικοί στα προϊόντα της Taq πολυμεράσης, η οποία δημιουργεί προϊόντα με 3' A άκρα. Κατά συνέπεια, η κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR διευκολύνεται με τον υβριδισμό μεταξύ των 3' A προεκβολών του προϊόντος της PCR και των 3' T προεκβολών του pZeTa (*TA cloning*). Τα προϊόντα της κλωνοποίησης, η οποία επετελέσθη όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.2.2., χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταμόρφωση επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* TOP10.

Τα TOP10 κύτταρα επωάστηκαν σε τρυβλία, που περιέχουν θρεπτικό υλικό μαζί με το αντιβιοτικό επιλογής (καναμυκίνη, καθώς ο φορέας pZeTa φέρει γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό αυτό), στους 37° C και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένες αποικίες, για την απομόνωση του πλασμιδιακού τους υλικού (mini-preps), προκειμένου να διαπιστωθεί η εισαγωγή του προϊόντος της PCR στον βακτηριακό φορέα. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από 24 διαφορετικούς, τυχαίους κλώνους (8 από το κάθε θετικό προϊόν της PCR). Ο έλεγχος εισαγωγής πραγματοποιήθηκε με πέψη των 24 απομονωμένων δειγμάτων πλασμιδιακού DNA με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Αναλυτικότερα, οι πλασμιδιακοί φορείς pZeTA, στους οποίους είχαν κλωνοποιηθεί τα προϊόντα της PCR, επωάστηκαν με τα ένζυμα BamHI και XhoI. Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα δύο αυτά ένζυμα ήταν το γεγονός ότι ο πλασμιδιακός φορέας έφερε θέσεις κοπής τόσο για την BamHI όσο και για την XhoI, ενώ τα προϊόντα της PCR είχαν ενσωματωμένες θέσεις κοπής μόνο για την XhoI. Με τον τρόπο αυτό, θα κοβόταν και με τις δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού μόνο οι κλώνοι στους οποίους είχε ενσωματωθεί το επιθυμητό ένθεμα.

Τα προϊόντα των 24 αντιδράσεων πέψης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης χαμηλού σημείου τήξεως (3%). Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαίωσε ότι δύο κλώνοι περιείχαν τα επιθυμητά ενθέματα, καθώς οι θετικοί κλώνοι (pZ-SDF1-4.1 και pZ-SDF1-4.7) εμφάνιζαν μετά την πέψη το κατάλληλο κομμάτι των 283 bp παράλληλα με τον γραμμικό φορέα κλωνοποίησης, ενώ οι αρνητικοί κλώνοι παρουσιάζονταν ως ανοικτά κομμάτια DNA μεγάλου μοριακού μεγέθους (~3299 bp), δηλαδή ως γραμμοποιημένα μόρια πλασμιδιακού φορέα.

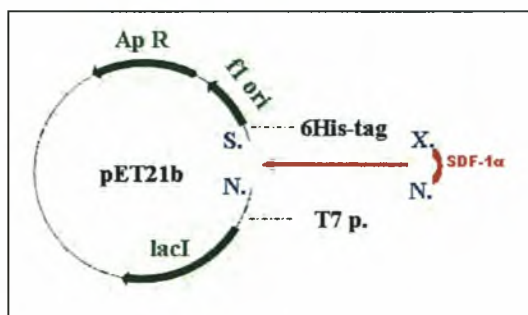


Εικόνα 16. Έλεγχος των Προϊόντων Κλωνοποίησης των Τμημάτων της PCR για την Παρουσία Ενθέματος

[M: Μάρτυρες Μεγέθους DNA – πλασμίδιο pBR322 που υπέστη πέψη με MspI. 1 – 8 : ανάλυση των προϊόντων κλωνοποίησης της PCR 2', 9 – 16: ανάλυση των προϊόντων κλωνοποίησης της PCR 4', 17 – 24: ανάλυση των προϊόντων κλωνοποίησης της PCR 5']

Γ.1.3. Κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του ώριμου SDF-1α στον βακτηριακό φορέα έκφρασης pET21b

Τα δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια pZ-SDF1-4.1 και pZ-SDF1-4.7 (Βλ. Εικόνα 16) επωάστηκαν με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού Nde I και Xho, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης κοπή των ενθεμάτων κωδικοποίησης του SDF-1α, τα οποία έφεραν ακραίες θέσεις αναγνώρισης για τις ενδονουκλεάσες αυτές. Τα προϊόντα των αντιδράσεων κοπής ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης χαμηλού σημείου τήξεως 3%, απομονώθηκαν τα τμήματα της πηκτής τα οποία περιείχαν τα ενθέματα μεγέθους 210 bp και, αφού τα τμήματα των πηκτών τήχθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65° C, ενσωματώθηκαν στον φορέα έκφρασης pET21b, με τη βοήθεια της T4 DNA λιγάσης, ο οποίος είχε υποστεί διάνοιξη με Nde I και Sal I. Οι Sal I και Xho I αφήνουν συμβατά κολλώδη άκρα. Λόγω του κατάλληλου σχεδιασμού των εκκινητών, η κωδική αλληλουχία του SDF-1α θα βρίσκεται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα που κωδικοποιεί μια «ουρά» 6 ιστιδινών (6His) και η οποία θα βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό τμήμα του SDF-1α.

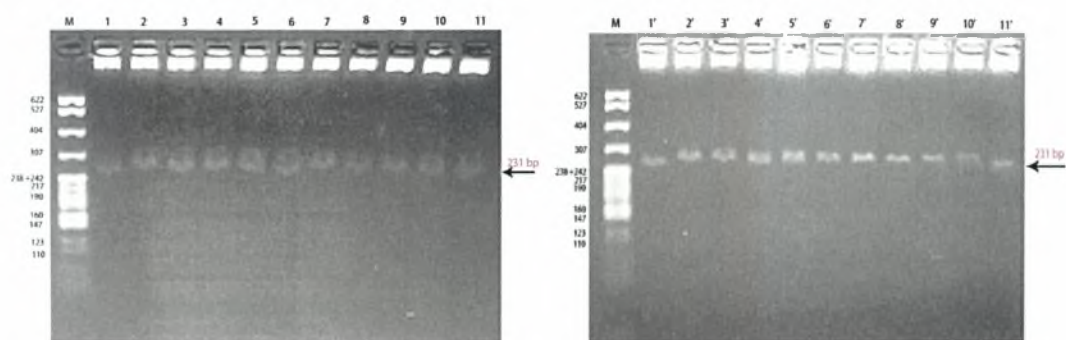


Εικόνα 17. Κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του SDF-1α στο βακτηριακό φορέα έκφρασης pET21b

Οι ανασυνδυασμένοι φορείς έκφρασης που προέκυψαν (pET21-SDF1-4.1 και pET21-SDF1-4.7), εισήχθησαν σε δεκτικά κύτταρα TOP10, με σκοπό να ελεγχθεί η επιτυχία της ένθεσης και έπειτα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα απομονωμένα δείγματα του πλασμιδιακού DNA επωάστηκαν (10 μ l / δείγμα) με επιλεγμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού, έτσι ώστε να εξακριβωθεί ποια από αυτά περιείχαν το ένθεμα των 210bp. Συγκεκριμένα, τα δείγματα επωάστηκαν με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού Nde I και XhoI. Καθώς η κωδική αλληλουχία, η οποία έφερε θέσεις κοπής για τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και XhoI, εισήχθη σε φορέα ο οποίος ήταν κομμένος με ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και Sall, αυτομάτως η θέση για το ένζυμο XhoI καταστράφηκε. Παρ' όλα αυτά, ο φορέας pET21b, φέρει δική του θέση κοπής για την ενδονουκλεάση περιορισμού XhoI, οπότε μετά την κοπή αναμένεται ένα μεγαλύτερο κομμάτι DNA, μοριακού μεγέθους 231 bp.

Μετά την κοπή, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως 3%, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της κοπής και η παρουσία του σωστού σε μέγεθος ενθέματος. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται παρακάτω, όπου επιβεβαιώνεται η εισαγωγή των επιθυμητών τμημάτων σε όλους τους επιλεγμένους κλώνους, καθώς το κατάλληλο κομμάτι (231 bp) εμφανίζεται, παράλληλα με τους γραμμικούς φορείς έκφρασης, σε όλες τις διαδρομές.



Εικόνα 18. Πέψη των Ανασυνδυασμένων Φορέων με Ενδονουκλεάσες Περιορισμού NdeI και XhoI

[M: Μάρτυρες Μεγέθους DNA – πλασμίδιο pBR322 που υπέστη πέψη με MspI, 1 – 11: προϊόντα πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET21-SDF1-4.1, 1' – 11': προϊόντα πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET21-SDF1-4.7]

Γ.1.4. Αλληλούχιση των ανασυνδυασμένων φορέων έκφρασης

Στο σημείο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η αλληλούχιση των ανασυνδυασμένων φορέων pET21-SDF1-4.1 και pET21-SDF-4.7, προκειμένου να εξακριβωθεί ότι τα προϊόντα της PCR, που κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pZeTA και εισήχθησαν τελικά στον φορέα έκφρασης pET21b, κωδικοποιούν όντως την ώριμη χημειοκίνη SDF-1α και δεν φέρουν κάποια μετάλλαξη. Παρά το γεγονός ότι ο αρχικός σχεδιασμός των εκκινητών της PCR ήταν σωστός και το μέγεθος του προϊόντος ήταν το αναμενόμενο, εντούτοις ο έλεγχος της αλληλουχία ήταν αναγκαίος για τους εξής λόγους:

- Για να εξακριβωθεί ότι η Taq2 πολυμεράση δεν έκανε κάποιο λάθος κατά την αντίδραση ενίσχυσης της αλληλουχίας – στόχου (η Taq πολυμεράση διαπράττει 1 λάθος ανά 10⁷ ζεύγη αντιγραφόμενων νουκλεοτιδίων)
- Για να διαπιστωθεί ότι οι εκκινητές επικάθισαν στις σωστές θέσεις και ενισχύθηκε η σωστή αλληλουχία – στόχος
- Για να επιβεβαιωθεί ότι η αλληλουχία του ενθέματος βρίσκεται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την αλληλουχία του φορέα έκφρασης που κωδικοποιεί την «ουρά» των 6His και ότι θα παραχθεί η ώριμη χημειοκίνη SDF-1α, συντηγμένη με την «ουρά» 6His στο καρβοξυ-τελικό άκρο της

Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τυχαία δύο από τους θετικούς κλώνους της εικόνας 18, οι οποίοι αναπτύχθηκαν και υποβλήθηκαν σε κατάλληλη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδίων υψηλής καθαρότητας (Βλ. Παράγραφο Β.2.6.). Τα καθαρά πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχιση και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω, έδειξαν ότι η αλληλουχία του ενθέματος ανήκε όντως στον SDF-1α. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι στον δεύτερο κλώνο (pET21-SDF1-4.7) υπήρχε διαφορά σε μια βάση σε σχέση με την αλληλουχία της βάσης δεδομένων. Συγκεκριμένα επρόκειτο για αντικατάσταση της βάσεως Α του αμινοξέος 22 του ώριμου SDF-1α (AAC) που κωδικοποιεί την ασπαραγίνη, σε G (GAC) που κωδικοποιεί το ασπαραγινικό οξύ και η οποία θα μπορούσε είτε να οφείλεται σε λάθος της Taq2 πολυμεράσης, είτε να αντιπροσωπεύει κάποιο πολυμορφισμό. Για

το λόγο αυτό, επιλέξαμε να προχωρήσουμε με τον πρώτο κλώνο, ο οποίος δεν έφερε κάποια μετάλλαξη και κωδικοποιούσε την ώριμη χημειοκίνη SDF-1α. Ο κλώνος αυτός ονομάστηκε pX-SDF1α, ενώ ο κλώνος που έφερε τη μετάλλαξη ονομάστηκε pX-SDF1α_{mut}.

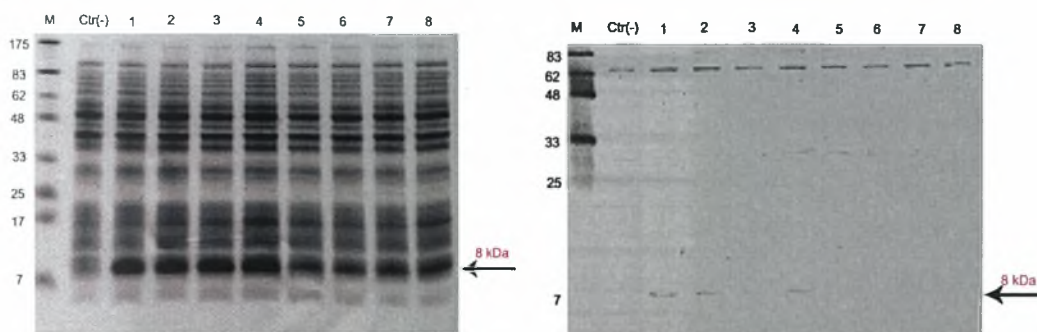
<p><u>pX-SDF1α</u></p> <p>CATATGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAA GCCATGTTGCCAGAGCCAACGGCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAAAC TGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCA TTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAG CTCGAG</p>
<p><u>pX-SDF1α_{mut}</u></p> <p>CATATGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAA GCCATGTTGCCAGAGCCGACGTCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAAAC TGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCA TTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAG CTCGAG</p>

Πίνακας 8. Αποτελέσματα Αλληλούχισης των Κλώνων pX-SDF1α και pX-SDF1α_{mut}
Με ροζ επισημαίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων και με κίτρινο η μετάλλαξη του δεύτερου κλώνου

Γ.1.5. Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α

Στο σημείο αυτό ο αλληλουχημένος φορέας pX-SDF1α χρησιμοποιήθηκε για τη μεταμόρφωση κυττάρων *E.coli* του στελέχους BL21[DE3], προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, μικρής κλίμακας καλλιέργειες των κυττάρων αυτών επωάστηκαν στις απαιτούμενες συνθήκες και ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (βλ. Παράγραφο Β.2.9.1), η οποία πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1 mM IPTG.

Μετά την επαγωγή τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, αιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης και αναλύθηκαν υπό μετουσιωτικές συνθήκες κατά SDS-PAGE. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή Tricine 12.5%, η οποία χρησιμοποιήθηκε για χρώση με Coomassie (CBB R250) και παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας ζώνης στο σωστό μοριακό μέγεθος των 8 kDa όπου αναμενόταν και ο SDF-1α. Προκειμένου να εξακριβωθεί ότι επρόκειτο για την σωστή πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε και ανοσοαποτύπωμα Western, όπου χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα που θα αναγνώριζε ειδικά την «ουρά» των 6His. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής φαίνονται στην εικόνα 19.



Εικόνα 19. Έκφραση της Πρωτεΐνης SDF-1α – 6His σε Βακτηριακά Κύτταρα BL21(DE3)

Ανάλυση σε πηκτή Tricine 12.5% και Ανοσοαποτύπωμα Western (10μl / δείγμα)

[M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακού μεγέθους, Ctl(-):πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταμορφωμένων βακτηριακών κυττάρων με άκοπο pET21b, 1-4: πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μεταμορφωμένων βακτηριακών κυττάρων με pX-SDF1α, 5-8: πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μεταμορφωμένων βακτηριακών κυττάρων με pX-SDF1αmut. Western: 1^ο αντίσωμα = anti-His mAb & 2^ο αντίσωμα = κουνελίσιο αντίσωμα ενάντια σε ανοσοσφαιρίνες ποντικού, συνδεδεμένο με HRP]

Γ.1.6. Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α

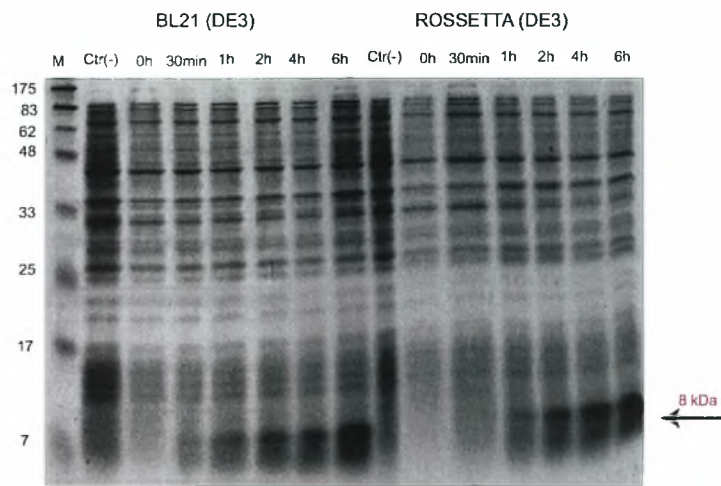
Πέραν της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α – 6His σε κύτταρα BL21[DE3], θεωρήθηκε απαραίτητη και η δοκιμή του στελέχους Rossetta [DE3] της E.coli, προκειμένου να ελεγχθεί εάν μπορούν να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της πρωτεϊνικής παραγωγής, να παραχθούν δηλαδή μεγαλύτερα ποσά ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η σκέψη αυτή προέκυψε από το γεγονός ότι το δεύτερο αυτό στέλεχος της E.coli παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά στην έκφραση ανασυνδυασμένων ανθρώπινων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα Rossetta [DE3]:

- Χαρακτηρίζονται ως [DE3], γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ξενιστής είναι λυσογόνο του λDE3 φάγου και φέρει κατά επέκταση ένα αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *IacUV5* υποκινητή. Τα λυσογόνα λ[DE3] είναι κατάλληλα για την παραγωγή πρωτεϊνών, των οποίων οι κωδικές αλληλουχίες έχουν κλωνοποιηθεί σε φορείς έκφρασης pET, όπου η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης γίνεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της RNA πολυμεράσης του φάγου T7.

- Φέρουν το πλασμίδιο «pRARE» το οποίο φέρει γονίδια επιλεγμένων tRNAs (tRNAs cassette) τα οποία αντιστοιχούν στα καλούμενα «προβληματικά» κωδικόνια της E.coli. Ως «προβληματικά» χαρακτηρίζονται τα κωδικόνια τα οποία, ενώ χρησιμοποιούνται συχνά από τον άνθρωπο, είναι σχετικά σπάνια στα βακτηριακά γονίδια. Κωδικοποιούν τα αμινοξέα Αργινίνη (AGA, AGG), Ισολευκίνη (AUA), Γλυκίνη (GGA), Λευκίνη (CUA) και Προλίνη (CCC). Τα αναφερόμενα αμινοξέα εμφανίζονται σε μεγάλη συχνότητα στις ακολουθίες των ανθρώπινων πρωτεϊνών. Κατά επέκταση, η παρουσία του pRARE στο κύτταρο της Rossetta καθιστά το συγκεκριμένο στέλεχος ικανό να παράγει τις ανασυνδυασμένες ανθρώπινες πρωτεΐνες σε πολύ μεγαλύτερα ποσά σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο του είδους.

Με βάση τα δεδομένα αυτά, θεωρήθηκε σημαντικό να συγκριθεί η απόδοση των δύο στελεχών BL21[DE3] και Rossetta[DE3] στην παραγωγή της ώριμης

χημειοκίνης SDF-1α. Κατά συνέπεια, ο ανασυνδυασμένος φορέας pX-SDF1α χρησιμοποιήθηκε για τη μεταμόρφωση κυττάρων E.coli, των στελεχών BL21[DE3] και Rossetta[DE3]. Βακτηριακές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες (37° C) και ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, με προσθήκη 0.5 mM IPTG, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (Βλ. Παράγραφο B.2.9.2). Ο έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή συγκέντρωσης 14%, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην εικόνα 20. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα του στελέχους Rossetta[DE3], ήταν σε θέση να εκφράζουν την χημειοκίνη SDF-1α όπως και τα BL21[DE3] κύτταρα, αλλά δεν έδιναν υψηλότερη και ταχύτερη παραγωγή. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, επιλέχθηκαν τα κύτταρα του στελέχους BL21[DE3] για την παραγωγή της SDF-1α σε μεγάλη κλίμακα.



Εικόνα 20. Έκφραση της Πρωτεΐνης SDF-1α - 6His σε Βακτηριακά Κύτταρα των Στελεχών BL21(DE3) και Rossetta (DE3)

[M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακού μεγέθους, Ctr(-): πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων που μεταμορφώθηκαν με άκοπο pET21b, 0-6h: πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων που μεταμορφώθηκαν με pX-SDF1α μετά από επαγωγή αντίστοιχων ωρών με IPTG]

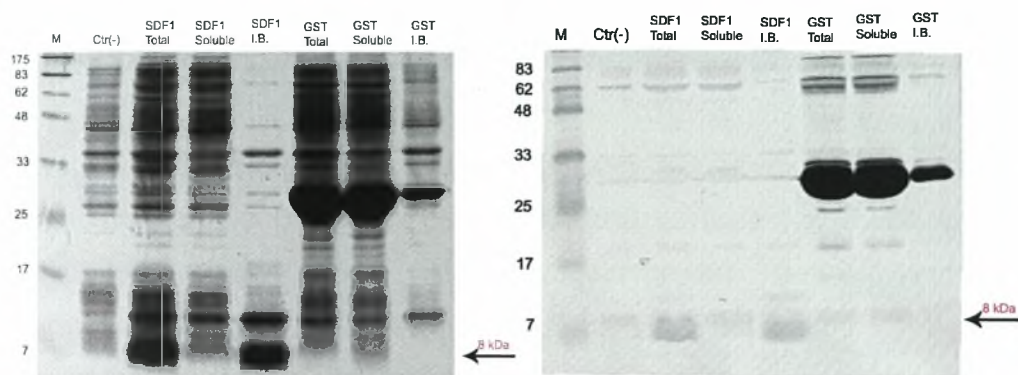
Γ.1.7. Έλεγχος της διαλυτότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α στο κύτταρο της *E.coli*

Στόχος του πειράματος αυτού ήταν η μελέτη της *in vivo* κατανομής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α στο κύτταρο της *E.coli*, συγκρίνοντάς τη με την κατανομή μιας πρωτεΐνης αναφοράς. Ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η θειοτρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), μια πρωτεΐνη 26 kDa, η οποία βρίσκεται διαλυτή στο κυτταρόπλασμα.

Μία τέτοιου τύπου ενδοκυτταρική κατανομή εξυπηρετεί ως εξής:

- Προδίδει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης – στόχου και δίνει πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργικότητα της. Όπως είναι γνωστό, το βακτηριακό κύτταρο αμύνεται, έχοντας τη δυνατότητα να απομονώνει πρωτεΐνες που δεν είναι ορθά αναδιπλωμένες, και κατά συνέπεια αδρανείς, σε σχηματισμούς που καλούνται βακτηριακά έγκλειστα. Επομένως, μία σωστά αναδιπλωμένη και δραστική πρωτεΐνη βρίσκεται διαλυτή στο κυτταρόπλασμα, ενώ μία ανορθόδοξα σχηματισμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται στα βακτηριακά έγκλειστα υπό τη μορφή αδρανούς συσσωματώματος.
- Διαφωτίζει τον τρόπο παραλαβής και καθαρισμού της πρωτεΐνης - στόχου από το βακτηριακό κύτταρο. Οι πρωτεΐνες των εγκλείστων παραλαμβάνονται με καθαρισμό δύο σταδίων: 1. Καθαρισμός βακτηριακών εγκλείστων και 2. Καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγενείας, υπό μετουσιωτικές συνθήκες, ενώ οι διαλυτές πρωτεΐνες παραλαμβάνονται άμεσα υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Για τη διεξαγωγή της μελέτης της *in vivo* κατανομής του SDF-1α αναπτύχθηκαν καλλιέργειες (της τάξεως των 500 ml) των κυττάρων BL21[DE3], που εξέφραζαν την χημειοκίνη SDF-1α – 6His. Η πειραματική αυτή διαδικασία διεξήχθη σύμφωνα με την περιγραφή της παραγράφου B.2.9.3. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση της *in vivo* κατανομής κατά SDS-PAGE. η οποία φαίνεται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21. Κατανομή της Ανασυνδυασμένης Πρωτεΐνης SDF-1α – 6His σε BL21(DE3) Κύτταρα

Ανάλυση κατά SDS-PAGE (14%) και Ανοσοαποτύπωμα Western (10μl / δείγμα)

[M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακού μεγέθους, Ctr(-): πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μεταμορφωμένων βακτηριακών κυττάρων με άκοπο pET21b. Western: 1^ο αντίσωμα = anti-His mAb & 2^ο αντίσωμα = κουνελίσιο αντίσωμα ενάντια σε ανοσοσφαιρίνες ποντικού, συνδεδεμένο με HRP]

Από την πειραματική αυτή διαδικασία διαπιστώθηκε πως η ανασυνδυασμένη χημειοκίνη SDF-1α – 6His συγκεντρώνεται κατά κύριο λόγο στα βακτηριακά έγκλειστα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ανασυνδυασμένη χημειοκίνη αποτυγχάνει να αναδιπλωθεί σωστά όταν υπερπαράγεται στα βακτηριακά κύτταρα και γι' αυτό «απομονώνεται» στα βακτηριακά έγκλειστα.

Γ.1.8. Καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α με στήλη χρωματογραφίας συγγενείας σε ακινητοποιημένο μέταλλο (IMAC)

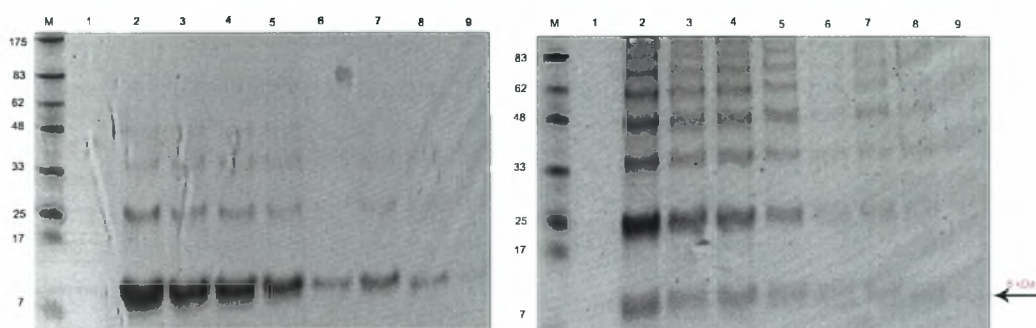
Αφού διαπιστώθηκε ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη SDF-1α συγκεντρώνεται αποκλειστικά στα βακτηριακά έγκλειστα στο κύτταρο της *E.coli*, ακολούθησε ο καθαρισμός της. Λόγω του ενδοκυτταρικού αυτού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης χημειοκίνης SDF-1α, η διαδικασία του καθαρισμού περιελάμβανε δύο ανεξάρτητα μεταξύ τους στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας αυτής, παραλαμβάνονται καθαρά τα βακτηριακά έγκλειστα, τα οποία στη συνέχεια κατεργάζονται κατάλληλα, προκειμένου να απομονωθεί η περιέχουσα πρωτεΐνη.

Ειδικότερα, για τον καθαρισμό σημαντικών ποσοτήτων της χημειοκίνης, αναπτύχθηκαν μεγάλες καλλιέργειες (της τάξεως των 2000ml) μεταμορφωμένων κυττάρων BL21[DE3] με τον φορέα pX-SDF-1α. Μετά από επαγωγή των κυττάρων με IPTG (0.5 mM) για 6 ώρες, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των καλλιεργειών και παραλαβή του κυτταρικού ιζήματος. Τα ληφθέντα κύτταρα, αφού επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα PBS, παρουσία αναγωγικού παράγοντα (1mM DTT), αναστολέα πρωτεασών (1 mM PMSF) και λυσοζύμης (0.2 mg/ml), υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπερήχους προκειμένου να σπάσουν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πλύσεων με επιλεγμένα απορρυπαντικά (Triton-X → Δεοξυχολικό Νάτριο → NP40) κατά σειρά αυξανόμενης ιονικής ισχύος, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά κατάλοιπα και να ληφθούν καθαρά τα βακτηριακά έγκλειστα.

Οι πρωτεΐνες των βακτηριακών εγκλείστων διαλυτοποιήθηκαν με τη χρήση ενός χαοτροπικού παράγοντα (Υδροχλωρική Γουανιδίνη) και το πρωτεϊνικό αυτό διάλυμα διήλθε μέσα από στήλη Ni-NTA για να πραγματοποιηθεί δέσμευση της SDF-1α – 6His στη στήλη και διαχωρισμός της χημειοκίνης από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Για να επιβεβαιωθεί ότι η στήλη δεν έχει κατακρατήσει άλλες πρωτεΐνες (μη-ειδική σύνδεση) πέραν της χημειοκίνης του ενδιαφέροντος, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις αυτής με μικρές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (30 mM). Τελικά, ο SDF-1α εκλούστηκε από τη στήλη με διάλυμα αυξημένης συγκέντρωσης

ιμιδαζολίου (500 mM) και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της εκλούμενης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

Τα κλάσματα τα οποία εκλούστηκαν από τη στήλη ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή tricine (12.5%), τόσο παρουσία του αναγωγικού παράγοντα DTT, όσο και απουσία αυτού, προκειμένου να διαπιστωθεί σε τι ποσοστό η πρωτεΐνη εκλούεται από τη στήλη σε μονομερή μορφή και σε τι ποσοστό σχηματίζει διμερή ή ολιγομερή.



Εικόνα 22. Καθαρισμός του SDF-1α – 6His με Χρωματογραφία Στήλης IMAC

Ανάλυση σε πηκτές Tricine 12.5%

[M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακού μεγέθους. 1^η πηκτή: ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης παρουσία DTT, 2^η πηκτή: ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης απουσία DTT]

Καθώς η έκλυση της πρωτεΐνης παρουσίαζε ένα ασυνήθιστα μεγάλο εύρος (η πρωτεΐνη αναμενόταν να εκλουσθεί στα πρώτα 6-8 κλάσματα, αλλά αντίθετα η παραλαβή σημαντικών ποσοτήτων πρωτεΐνης συνεχίστηκε μέχρι τη συλλογή 15 συνολικά κλασμάτων), θελήσαμε να ελέγξουμε εάν στα τελευταία κλάσματα ο SDF-1α εκλούεται ως μονομερές ή αν πρόκειται για ολιγομερείς δομές αυτού. Έτσι, τα πρώτα 5 κλάσματα συγκεντρώθηκαν μαζί σε μία «δεξαμενή» [SDF-1α (pool 1)] και τα υπόλοιπα 10 συγκεντρώθηκαν σε μία δεύτερη «δεξαμενή» [SDF-1α (pool 2)]. Αφού υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιέχεται στην κάθε δεξαμενή, με τη μέθοδο Bradford, η συγκέντρωση της πρώτης δεξαμενής αραιώθηκε, προκειμένου η ποσότητα της πρωτεΐνης να είναι η ίδια και στα δύο δείγματα και τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

Μετά τον πρωτεϊνικό καθαρισμό, το δείγμα της πρωτεΐνης της κάθε δεξαμενής χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εξής:

- Το πρώτο μέρος της πρωτεΐνης διαπιδύθηκε σε διάλυμα 1x PBS, στο οποίο είχε προστεθεί το οξειδοαναγωγικό σύστημα της γλουταθειόνης (1mM GSH / 0.5 mM GSSG).
- Το δεύτερο μέρος της πρωτεΐνης διαπιδύθηκε στο ίδιο διάλυμα 1x PBS, απουσία του οξειδοαναγωγικού συστήματος GSH/GSSG, στο οποίο είχε προστεθεί μόνον 0.1 mM διθειοθρεϊτόλης (DTT).

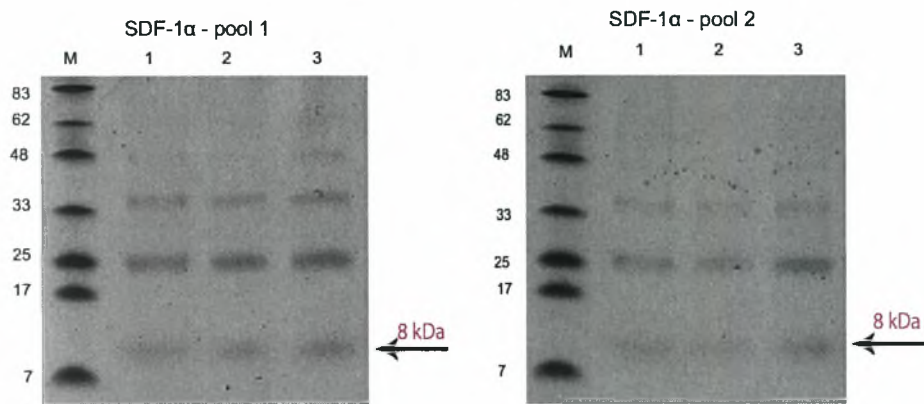
Μετά από 16-18 ώρες, τα διαλύματα διαπίδυσης αντικαθίστανται από φρέσκα, της ίδιας σύστασης, στα οποία έχει επιπλέον προστεθεί και 10% γλυκερόλη, προκειμένου να επιτευχθεί απομάκρυνση όλης της ποσότητας της ουρίας και του ιμιδαζολίου, καθώς επίσης και συμπύκνωση της πρωτεΐνης (Βλ. Παράγραφο Β.2.11). Μετά τη διαπίδυση, η συγκέντρωση της καθαρής διαλυτής πρωτεΐνης επαναπροσδιορίστηκε με τη μέθοδο **Bradford**.

Δείγμα	Capx. (mg/ml)	CTEL.(mg/ml) + GSSG / GSH	CTEL. (mg/ml) + DTT
SDF-1α (pool 1)	3.6	0.8	0.5
SDF-1α (pool 2)	1.35	0.74	0.64

Πίνακας 9. Καθαρισμένος SDF-1α πριν και μετά την αναδίπλωση
Ανάλυση κατά Bradford

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το δείγμα SDF-1α (pool 1) αραιώθηκε, έτσι ώστε και στα δύο δείγματα η συγκέντρωση πριν τη διαπίδυση να ισούται περίπου με 1.35 mg/ml.

Τελικά, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτές tricine (12.5%) και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται στην εικόνα 23.



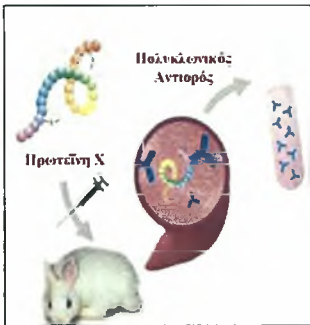
Εικόνα 23. Έλεγχος της Διαλυτότητας της Ανασυνδυασμένης Πρωτεΐνης SDF-1α – 6His

Ανάλυση σε Πηκτές Tricine 12.5%

[M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακού μεγέθους, 1: προ διαπίδυσης, 2: διαπίδυση παρουσία GSSG/GSH, 3: διαπίδυση παρουσία DTT]

Γ.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SDF-1α ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Στο σημείο αυτό κρίθηκε σημαντική η μελέτη της ικανότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SDF-1α να λειτουργήσει ως αντιγόνο. Η καθαρή, διαλυτή πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση ενός κόνικλου, προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα πρόκλησης παραγωγής αντισωμάτων.



Εικόνα 24. Παραγωγή Πολυκλωνικών Αντισωμάτων

Διαφοροποιημένη Αναπαραγωγή από www.bioworld.com images 500500

Το σχήμα ανοσοποίησης που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στον πίνακα 10:

Ημέρα 0	Λήψη Προάνοσου Ορού	
Ημέρα 2 ^η	Δόση Εφόδου	
Ημέρα 16 ^η	1 ^η Αναμνηστική Δόση	
Ημέρα 30 ^η	2 ^η Αναμνηστική Δόση	
Ημέρα 45 ^η	3 ^η Αναμνηστική Δόση	
Ημέρα 53 ^η	1 ^η Συλλογή Ορού	
Ημέρα 60 ^η	4 ^η Αναμνηστική Δόση	
Ημέρα 70 ^η	2 ^η Συλλογή Ορού	
Ημέρα 78 ^η	5 ^η Αναμνηστική Δόση	
Ημέρα 86 ^η	3 ^η Συλλογή Ορού	

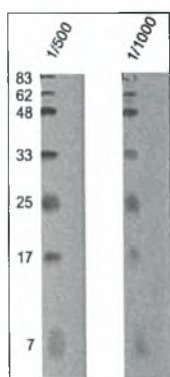
Δόση Εφόδου (μg)	200
Αναμνηστική Δόση (μg)	100

Πίνακας 10. Σχήμα Ανοσοποίησης Κόνικλου

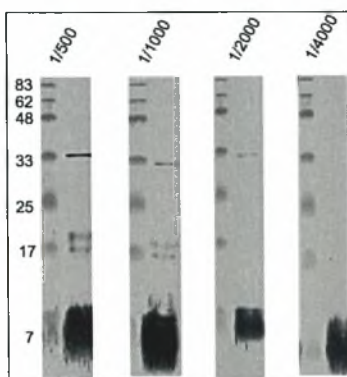
Γ.2.1. Συλλογή και Έλεγχος του Τίτλου των Αντιορών

Μετά από 8 με 10 ημέρες από την χορήγηση του εκάστοτε αντιγόνου, ακολουθούσε συλλογή του αντίστοιχου πολυκλωνικού αντιορού και ανάλυση αυτού με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης Western (σύμφωνα με το πρωτόκολλο B.16.4), προκειμένου να ελεγχθεί ο τίτλος των περιεχόμενων αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα της κάθε ανάλυσης παρουσιάζονται στην εικόνα 25.

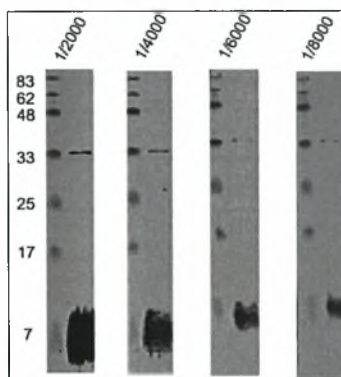
Προάνοσος Ορός



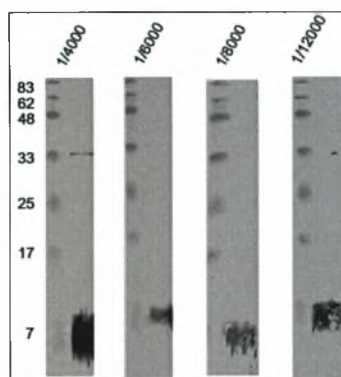
1^η Συλλογή Ορού



2^η Συλλογή ορού



3^η Συλλογή Ορού



Εικόνα 25. Έλεγχος του Τίτλου των Πολυκλωνικών Αντισωμάτων με strips Νιτροκυτταρίνης
Ανοσοαποτύπωμα Western

[Κάθε strip φέρει καθαρισμένα βακτηριακά έγκλειστα στα οποία περιέχεται ο ανασυνδυασμένος SDF-1α – 6His, 1^ο αντίσωμα: anti-SDF1α, 2^ο αντίσωμα: anti-rabbit IgG-HRP]

Όπως φαίνεται από τα ανοσοαποτυπώματα, ο τίτλος των λαμβανομένων αντιορών ήταν ικανοποιητικός από την 1^η κιόλας συλλογή, δηλαδή μετά την τρίτη χορήγηση της αναμνηστικής δόσης του αντιγόνου. Συγκεκριμένα, ο κόνικλος που έλαβε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη SDF-1α παρήγαγε ταχύτατα τα αντίστοιχα αντισώματα σε διάστημα 53 ημερών.

Κατά συνέπεια αποδείχθηκε ότι ο ανασυνδυασμένος SDF-1α ήταν σε θέση να προκαλεί άμεσα και έντονα τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος του κόνικλου που χρησιμοποιήθηκε.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο λόγος που επιλέξαμε να ασχοληθούμε με το δίκτυο των χημειοκινών, ήταν ο ιδιαίτερος ρόλος που έχουν οι πρωτεΐνες αυτές, τόσο στην οργάνωση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην προστασία του οργανισμού έναντι λοιμογόνων παραγόντων, όσο και η συμμετοχή τους σε ορισμένες ασθένειες, π.χ. αθηροσκλήρωση, διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, αλλά και το σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Ήδη πολλές χημειοκίνες δοκιμάζονται ως θεραπευτικά μέσα, όπως παραδείγματος χάριν η χημειοκίνη CXCL10 (IP10), η οποία χρησιμοποιείται, είτε μόνη της είτε συζευγμένη με κάποια αντισώματα, για τη θεραπεία του καρκίνου.

Ο στόχος της παρούσης διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση, έκφραση και παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων βιολογικά δραστικής χημειοκίνης SDF-1α δηλαδή του προερχόμενου από κύτταρα του στρώματος παράγοντα-1α (Stromal cell-derived factor-1α / SDF-1α).

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της χημειοκίνης SDF-1α, μπορεί να οδηγήσει στην εφαρμογή και μελέτη της δράσης της σε επιλεγμένα βιολογικά συστήματα αλλά και να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο στην αντιμετώπιση του ιού της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου-1 (HIV-1), μιας και ο ιός εκμεταλλεύεται τον υποδοχέα της χημειοκίνης αυτής, δηλαδή τον CXCR4, ως συνυποδοχέα προκειμένου να εισέλθει στα T-λεμφοκύτταρα.

Ο SDF-1α αποτελείται από 89 αμινοξέα, εκ των οποίων τα 21 πρώτα αποτελούν το σηματοδοτικό πεπτίδιο, το οποίο καθοδηγεί την πρωτεΐνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκειμένου να αναδιπλωθεί σωστά πριν να οδηγηθεί στη συσκευή Golgi και εκκριθεί. Το σηματοδοτικό πεπτίδιο πρέπει να αποκοπεί προκειμένου η πρωτεΐνη να λάβει τη σωστή διαμόρφωση και να είναι ενεργή. Για το λόγο αυτό, κατά τη διαδικασία ενίσχυσης του cDNA του ανθρώπινου SDF-1α ενισχύσαμε μόνο τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν την ώριμη χημειοκίνη, χωρίς το σηματοδοτικό πεπτίδιο (αα 22-89). Ως υποστρώματα για την ενίσχυση της παραπάνω περιοχής χρησιμοποιήθηκαν cDNAs τα οποία κατασκευάσθηκαν από mRNA προερχόμενα από ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Μετά από πολλές αποτυχημένες προσπάθειες ενίσχυσης με PCR, ακολουθήσαμε μια παραλλαγή της μεθόδου, τη nested PCR, η

οποία περιλαμβάνει δύο διαδοχικές αντιδράσεις ενίσχυσης με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η ενίσχυση των μη-ειδικών προϊόντων. Η προσέγγιση αυτή ήταν απόλυτα επιτυχημένη και τα προϊόντα της κλωνοποιήθηκαν στον κατάλληλα επεξεργασμένο βακτηριακό φορέα pZero2.1 με TA-κλωνοποίηση. Τελικά, η κωδική περιοχή του SDF-1α κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET21b, μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI & XhoI προκειμένου να παραχθεί ανασυνδυασμένος SDF-1α που θα φέρει στο καρβοξυτελικό του άκρο μια «ουρά» 6 ιστιδινών (6His). Η ουρά αυτή είναι χρήσιμη τόσο στην ταυτοποίηση της πρωτεΐνης όσο και στον μετέπειτα καθαρισμό της με χρωματογραφία αγκιστείας σε καθηλωμένο μέταλλο (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) με χρήση στήλης αгарόζης-Ni-NTA. Η «ουρά» αυτή εισήχθη στο καρβοξυ-τελικό τμήμα του SDF-1α, γιατί εισαγωγή της στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης θα προκαλούσε αναστολή της λειτουργικότητας της χημειοκίνης, όπως έχει δείχθει σε πλείστες περιπτώσεις. Οι δύο ανασυνδυασμένοι φορείς που προέκυψαν, δηλαδή ο pET21b-SDF1-4.1 και ο pET21b-SDF1-4.7, αλληλουχήθηκαν, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι πράγματι περιέχουν την κωδική αλληλουχία του SDF-1α στην οποία δεν έχει εισαχθεί κάποια μετάλλαξη, π.χ. κατά τη διαδικασία ενίσχυσης ή κλωνοποίησης. Από την αλληλούχιση διαπιστώθηκε πως στον ένα κλώνο (pX-SDF-1α_{mut}) υπήρχε διαφορά σε μία βάση, η οποία άλλαζε την αμινοξική αλληλουχία, γι' αυτό και οι υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με τον κλώνο που δεν έφερε μεταλλάξεις, τον pX-SDF1α. Τα στελέχη BL21[DE3] και Rossetta[DE3] της *E.coli*, τα οποία υπό κατάλληλες συνθήκες εκφράζουν την T7 RNA πολυμεράση που οδηγεί στην έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, μεταμορφώθηκαν με τον pX-SDF1α, έτσι ώστε να παραχθεί ανασυνδυασμένος SDF1α και να συγκριθεί η απόδοση των στελεχών στην παραγωγή της χημειοκίνης. Το πλεονέκτημα του στελέχους Rossetta[DE3] έναντι του BL21[DE3] ήταν ότι εκφράζει κάποια tRNA με σπάνια για την *E.coli* αλλά σύννηθη για τους ευκαρυώτες αντικωδικόνια, με αποτέλεσμα έτσι να παράγουν μεγαλύτερα ποσά ανασυνδυασμένων ανθρώπινων πρωτεϊνών. Αφού διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν ιδιαίτερες διαφορές στην απόδοση των δύο στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τελικά τα απλούστερα BL21[DE3] για την παραγωγή του SDF-1α σε μεγάλη κλίμακα. Στο σημείο αυτό, προκειμένου

να διαπιστωθεί η διαλυτότητα του ανασυνδυασμένου SDF-1α προσδιορίστηκε η κατανομή του στο κυτταρόπλασμα ή στα βακτηριακά έγκλειστα, χρησιμοποιώντας την καλά μελετημένη διαλυτή πρωτεΐνη θειοτρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) ως μάρτυρα. Παρατηρήθηκε με τον τρόπο αυτό, ότι ο ανασυνδυασμένος SDF-1α συγκεντρωνόταν στα βακτηριακά έγκλειστα γεγονός που σημαίνει ότι αποτυγχάνει να αναδιπλωθεί σωστά. Για το λόγο αυτό, ο SDF-1α θα έπρεπε να παραληφθεί υπό μετουσιωτικές συνθήκες από τα βακτηριακά έγκλειστα, καθώς το ποσοστό παρουσίας του στο κυτταρόπλασμα ήταν ελάχιστο. Έτσι καθαρίστηκαν αρχικά τα βακτηριακά έγκλειστα, οι πρωτεΐνες που περιέχονται σε αυτά μετουσιώθηκαν με τη χρήση χαοτροπικών παραγόντων και το πρωτεϊνικό διάλυμα διήλθε μέσα από στήλη Ni-NTA. Καθώς στο καρβοξυ-τελικό άκρο του ανασυνδυασμένου SDF-1α είχε εισαχθεί μια «ουρά» 6 ιστιδινών, στο καθηλωμένο με NTA νικέλιο της στήλης θα δεσμευόταν μόνο οι πρωτεΐνες οι οποίες έφεραν ουρές ιστιδινών. Προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεΐνες που είχαν συνδεθεί μη-εκλεκτικά, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση αυτών με χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου, ενώ ο SDF-1α **εκλούσθηκε** με 0.5M ιμιδαζολίου. Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες οι οποίες είχαν καθαριστεί στο εργαστήριο με τη μέθοδο αυτή και παρουσίαζαν μία «κορυφή» στην έκλουσή τους, ο SDF-1α παρουσίαζε ένα ασυνήθιστα ευρύ φάσμα έκλουσης. Αρχικά υποθέσαμε ότι στα τελευταία κλάσματα έκλουσης ο SDF-1 θα σχημάτιζε ολιγομερή, γι' αυτό και αναλύσαμε τα κλάσματα αυτά σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου τόσο παρουσία αναγωγικού παράγοντα στο διάλυμα επιστοίβαξης όσο και απουσία αυτού. Αυτό που διαπιστώσαμε ήταν η ύπαρξη ολιγομερών δομών του SDF-1α από τα πρώτα κλάσματα, και όχι μόνο στα τελευταία, και μάλιστα ο σχηματισμός των διαμοριακών αυτών δεσμών παρατηρούνταν σε μεγάλο βαθμό. Αφού παραλήφθηκε η πρωτεΐνη σε αρκετά καθαρή μορφή, ακολούθησαν πειράματα αναδίπλωσής της *in vitro* με απομάκρυνση του μετουσιωτικού παράγοντα με διαπίδυση υπό δύο διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή είτε παρουσία του οξειδοαναγωγικού συστήματος GSSG / GSH ή παρουσία μόνο του αναγωγικού παράγοντα DTT. Η προσθήκη του οξειδοαναγωγικού συστήματος GSSG / GSH είχε ως στόχο την αποτροπή του σχηματισμού τυχαίων δισουλφιδικών δεσμών (ενδομοριακών ή διαμοριακών) μεταξύ των μορίων της χημειοκίνης. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην ικανότητα του

μορίου να προσλαμβάνει τα ελεύθερα ηλεκτρόνια που προκύπτουν και να μεταπίπτει εύκολα από την ανηγμένη του μορφή (GSH) στην οξειδωμένη (GSSG), εξασφαλίζοντας ότι οι οξειδοαναγωγικές αλλαγές δεν θα επηρεάσουν την αναδίπλωση και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του οξειδοαναγωγικού συστήματος βοηθούσε μεν στην ορθή αναδίπλωση του SDF-1, δίνοντας ελαφρώς μεγαλύτερα ποσά καθαρής διαλυτής πρωτεΐνης, σε σύγκριση με αυτά που προκύπτουν παρουσία του DTT, παρ' όλο που ένα μεγάλο ποσοστό της πρωτεΐνης εξακολουθούσε να βρίσκεται σε ολιγομερή μορφή.

Επιπλέον θελήσαμε να ελέγξουμε την αντιγονικότητά του SDF-1α, γι' αυτό και ανοσοποήσαμε ένα κόνικλο και συλλέξαμε τους αντίστοιχους πολυκλωνικούς αντιορούς. Από την διαδικασία αυτή διαπιστώσαμε πως η ανασυνδυασμένη αυτή πρωτεΐνη ήταν σε θέση να προκαλεί την άμεση και έντονη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος του κόνικλου και μάλιστα ο τίτλος των αντισωμάτων που συλλέξαμε ήταν ιδιαίτερα υψηλός.

Επιπλέον στόχοι που είχαν τεθεί ήταν ο καθαρισμός των αντισωμάτων, καθώς και η μελέτη της βιολογικής ενεργότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, τους οποίους όμως δεν προλάβουμε να πραγματοποιήσουμε, αλλά θα θέλαμε στο μέλλον να εξετάσουμε.

Η έκφραση της ώριμης χημειοκίνης SDF-1α και η παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων αυτής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων του μορίου αυτού. Η μελέτη αυτή μπορεί να αφορά, τόσο στα χαρακτηριστικά της σύνδεσής του με τον υποδοχέα του, τον CXCR4, όσο και στην ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης και στο ρόλο του στη χημειοταξία και στην αγγειογένεση. Ο συνδυασμός των παραπάνω, μαζί με τη μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων του SDF-1, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο θεραπευτικό εργαλείο, για την ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων, τα οποία θα έχουν ως στόχο, την παρεμπόδιση της σύνδεσης του HIV-1 επί του CXCR4 υποδοχέα και την είσοδο του ιού στα Τ-λεμφοκύτταρα και κατά συνέπεια, την ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης, τα οποία βοηθούν στην εξάπλωση του ιού και στην απόπτωση των κυττάρων-στόχων του.

E. Βιβλιογραφία

1. Olson, T.H. and K. Ley, *Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking*. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, 2002. **283**: 7-28.
2. Rollins, B.G., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): 909-928.
3. Belperio, J.A., et al., *CXC chemokines in angiogenesis*. Journal of Leukocyte Biology, 2000. **68**: 1-8.
4. Auerbach, R., et al., *Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues, and lymphocytes*. Cancer Res, 1976. **36**: 3435-3540.
5. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat. Med., 1992. **1**: 27-31.
6. Folkman, J., et al., *Angiogenesis*. The Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**, 10931-10934.
7. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin. Cancer Biol., 1992. **3**: 65-71.
8. Folkman, J., Brem, H., *Angiogenesis and inflammation*. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed. (J. I. Gallin, I.M. Goldstein, and R. Snyderman, eds.), New York: Raven, 821-839.
9. Polverini, P.J., *The Pathophysiology of angiogenesis*. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1995. **6**: 230-247.
10. Strieter, R. M., et al., *The functional role of the ELR motif in CXC chemokine - mediated angiogenesis*. The Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**: 27348-27357.
11. Angiolillo, A. L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. J. Exp. Med., 1995. **182**: 155-162.
12. Koch, A. E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. Science, 1992. **258**: 1798-1801.
13. Strieter, R.M., et al., *Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization*. Am. J. Pathol., 1992. **141**: 1279-1284.
14. Norrby, K., *Interleukin-8 and de novo mammalian angiogenesis*. Cell Prolif., 1996. **29**: 315-323.

15. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. **392**: 565–568.
16. Adams, D. H., Lloyd, A. R., *Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines*. Lancet, 1997. **349**: 490–495.
17. Strieter, R. M., et al., *The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis*. Shock, 1995. **4**: 155–160.
18. Taub, D. D., Oppenheim, J. J., *Chemokines, inflammation and the immune system*. Ther. Immunol. 1994. **1**: 229–246.
19. Balkwill, F., *The molecular and cellular biology of the chemokines*. J. Viral. Hepat. 1998. **5**: 1–14.
20. Farber, J. M., *Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes*. Journal of Leukocyte Biology, 1997. **61**: 246–257.
21. Farber, J. M., *A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990. **87**: 5238–5242.
22. Farber, J. M., *A collection of mRNA species that are inducible in the RAW 264.7 mouse macrophage cell line by gamma interferon and other agents*. Molecular Cell Biology, 1992. **12**: 1535–1545.
23. Luster, A. D., et al., *Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins*. Nature, 1985. **315**: 672–676.
24. Luster, A. D., Ravetch, J. V., *Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)*. J. Exp. Med., 1987. **166**: 1084–1097.
25. Arenberg, D. A., et al., *In vitro and in vivo systems to assess role of C-X-C chemokines in regulation of angiogenesis*. Meth. Enzymol. 1997. **288**: 190–220.
26. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science 1996. **272**: 872.
27. Wyatt, R., and J. Sodroski., *The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens*. Science 1998. **280**: 1884.
28. Moore, J. P., et al., *The CCR5 and CXCR4 coreceptors - central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection*. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 2004. **20**: 111.

29. Marschner, S., et al., *Ligation of human CD4 interferes with antigen-induced activation of primary T cells*. Immunol. Lett. 2002. **82**: 131.
30. Chirmule, N., and S. Pahwa. *Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: Profound influences on immune functions*. Microbiol. Rev., 1996. **60**: 386.
31. Zhang, R., et al., *CD40 ligand dysregulation in HIV infection: HIV glycoprotein 120 inhibits signaling cascades upstream of CD40 ligand transcription*. J. Immunol. 2004. **172**: 2678.
32. Esser, M. T., et al. *Partial activation and induction of apoptosis in CD4+ and CD8+ T lymphocytes by conformationally authentic noninfectious human immunodeficiency virus type 1*. J. Virol. 2001. **75**: 1152.
33. Kinter, A., et al., *Chemokines, cytokines and HIV: A complex network of interactions that influence HIV pathogenesis*. Immunol. Rev., 2000. **177**: 88.
34. Stantchev, T. S., and C. C. Broder. *Human immunodeficiency virus type-1 and chemokines: Beyond competition for common cellular receptors*. Cytokine Growth Factor Rev., 2001. **12**: 219.
35. Balabanian K., et al., *CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2004. **173**: 7150-7160.
36. Jolly, C., et al., *HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse*. J. Exp. Med, 2004. **199**: 283.
37. Arai, J., et al., *Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of Stromal cell-derived factor-1*. Eur. J. Haematol., 2000. **64**: 323-333.
38. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**: 495-500.
39. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*. Gene, 2006. **374**: 174-179.
40. Crump, M. P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of Stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. The EMBO Journal, 1997. **23**: 6996-7007.
41. Garcia-Moruja, C., *Functional characterization of SDF-1 proximal promoter*. J. Mol. Biol., 2005. **348**: 43-62.

42. Breathnach, R. & Chambon, P., *Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins*. Annu. Rev. Biochem., 1981. **50**: 349-383.
43. Smale, S. T., *Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes*. Biochim. Biophys. Acta, 1997. **1351**: 73-88.
44. Mukaida, N., et al., *Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines*. J. Biol. Chem., 1999. **265**: 21128-21133.
45. Griffin, C. A., et al., *Human platelet factor 4 gene is mapped to 4q12-q21*. Cytogenet. Cell Genet., 1987. **45**: 67-69.
46. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF / SDF-1*. Nature, 1996. **382**: 635-638.
47. Zou, Y. R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**: 595-599.
48. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1- deficient mice*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1998. **5**: 9448-9453.
49. New, D.C. and Y.H. Wong, *Molecular mechanisms mediating the G-protein coupled receptor regulation of cell cycle progression*. Journal of Molecular Signaling, 2007. **2**(2): 1-15.
50. Rozengurt E, Rodriguez-Fernandez JL., *Tyrosine phosphorylation in the action of neuropeptides and growth factors*. Essays Biochem. 1997. **32**: 73.
51. Longhurst CM, Jennings LK., *Integrin-mediated signal transduction*. Cell Mol Life Sci. 1998. **54**: 514.
52. Jian-Feng Wang, et al., *Stromal cell-derived factor-1a stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C*. Blood, 2000. **95**: 2505-2513.
53. Ganju RK, et al., *The alpha- chemokine, stromal cell-derived factor-1 alpha, binds to the transmembrane G-protein coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways*. J Biol Chem. 1998. **273**: 23,169.

54. Li, X., et al., *Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase*. J. Biol. Chem. 1999. **274**: 8917.
55. Harte M. T., et al., *p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase*. J. Biol. Chem. 1996. **271**: 13,649
56. Luo, J., et al., *Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise*, Cancer Cell, 2003. **4**: 257-262.
57. Vlahakis, S. R., et al., *G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signalling pathways*. The Journal of Immunology, 2002. **169**: 5546-5554.
58. Karin, M., Ben Neria, Y., *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B*. Annu. Rev. Immunol., 2000. **18**: 621.
59. Baeuerle, P. A., Baltimore, D., *NF- κ B: ten years after*. Cell, 1996. **87**: 13.
60. Ghosh, S., et al., *NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu. Rev. Immunol., 1998. **16**: 225.
61. Read, M. A., et al., *Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(β (TrCP))-dependent ubiquitination of I κ B α* . Mol. Cell Biol., 2000. **20**: 2326.
62. Oliveira, I. C., Mukaida, N., Matsushima, K., and Vilcek, J., Mol. Cell. Biol., 1994. **14**: 5300-5308
63. Beg, A. A., and Baltimore, D., Science, 1996. **274**: 782-784.
64. Wang, C. Y., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr., Science, 1996. **274**: 784-787.
65. Nabel, G., and Baltimore, D., Nature, 1987. **326**, 711-713.
66. Chang, L. & Karin, M., *Mammalian Map kinase signalling cascades*, Nature, 2001. **410**: 37-40.
67. Meisenhelder J, et al., *Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro*. Cell, 1989. **57**: 1109.
68. Scharenberg A.M. , Kinet J. P., *PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals*. Cell, 1998. **94**: 5.

69. Vila-Coro, A. J., et al., *The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK / STAT pathway*. *Faseb. J.*, 1999. 1699-1710.
70. Imada, K., & Leonard, W. J., *Mol. Immunol.*, 2000. **37(1-2)**: 1-11.
71. Jove, R., *Oncogene*, 2000. **19(21)**: 2466-2467.
72. Vroon, A., et al., *GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006. **80**: 1214-1221.
73. Ferguson, S. S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. *Pharmacol. Rev.*, 2001. **53**:1–24.
74. Pitcher, J. A., et al., *G protein-coupled receptor kinases*. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998. **67**: 653–692.
75. Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J., *Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization*. *Mol. Pharmacol.*, 2003. **63**: 9–18.
76. Penela, P., Ribas, C., Mayor Jr., F., *Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases*. *Cell. Signal.*, 2003. **15**: 973–981.
77. Pierce, K. L., Lefkowitz, R. J., *Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors*. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001. **2**: 727–733.
78. Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., *The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. *J. Cell Sci.*, 2002. **115**: 455–465.
79. Lefkowitz, R. J., Whalen, E. J., *β -Arrestins: traffic cops of cell signalling*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004. **16**: 162–168.
80. Lefkowitz, R. J., Shenoy, S. K., *Transduction of receptor signals by β -arrestins*. *Science*, 2005. **308**: 512–517.
81. Iozzo, R. V., *Annu. Rev. Biochem.*, 1998. **67**: 609–652.
82. Kjellen, L., and Lindahl, U., *Annu. Rev. Biochem.*, 1991. **60**: 443–475.
83. Hardingham, T. E., and Fosang, A. J., *FASEB J.*, 1992. **6**, 861–870.
84. Tanaka, Y., Adams, D. H., and Shaw, S., *Immunol. Today*, 1993. **14**: 111–115.
85. Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A., and Wells, T. N., *Biochemistry*, 1997. **36**: 13570–13578.

86. Koopmann, W., and Krangel, M. S., J. Biol. Chem., 1997. **272**: 10103–10109.
87. Webb, L. M., Ehrenguber, M. U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Rot, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993. **90**: 7158–7162.
88. Maione, T. E., Gray, G. S., Hunt, A. J., and Sharpe, R. J., Cancer Res., 1991. **51**: 2077–2083.
89. Stuckey, J. A., St. Charles, R., and Edwards, B. F., Proteins, 1992. **14**: 277–287.
90. Loscalzo, J., Melnick, B., and Handin, R. I., Arch. Biochem. Biophys., 1995. **240**: 446–55.
91. Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I., The EMBO J., 1997. **16**: 6996–7007.
92. Dealwis, C., Fernandez, E. J., Thompson, D. A., Simon, R. J., Siani, M. A., and Lolis, E., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998. **95**: 6941–6946.
93. Amara, A., et al., *Stromal Cell-derived Factor-1a Associates with Heparan Sulfates through the First b-Strand of the Chemokine*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999. **34**: 23916–23925.

